

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Paweł Konieczny

Rola kinazy aktywowanej AMP (AMPK) w regulacji procesu  
przerzutowania komórek nowotworowych

*Praca doktorska*

Promotor: Prof. dr hab. Marcin Majka

Praca wykonana w Zakładzie Transplantologii

Katedra Immunologii Klinicznej i Transplantologii

Kierownik jednostki Prof. dr hab. Maciej Siedlar

*Kraków, 2019*

---

# Spis treści

---

1. Streszczenie.....	6
2. Wstęp.....	9
2.1.Deregulacja metaboliczna w procesach nowotworowych .....	10
2.2.Efekt Warburga.....	11
2.3.Historia odkrycia i badań nad AMPK.....	13
2.4.Budowa i struktura AMPK .....	14
2.5.Regulacja AMPK.....	17
2.7.Rola AMPK w nowotworach i terapiach antynowotworowych .....	21
2.8.Mechanizmy molekularne przerzutowania komórek nowotworowych .....	22
3. Cele projektu .....	28
4. Materiały i metody .....	30
4.1.Hodowle ludzkich linii komórkowych.....	31
4.2.Chemotaksja .....	31
4.3.Barwienie immunofluorescencyjne .....	32
4.4.Izolacja całkowitego RNA.....	33
4.5.Odwrotna transkrypcja RNA .....	33
4.6.PCR w czasie rzeczywistym .....	34
4.7.Izolacja białka .....	35
4.7.1. Izolacja całkowitej frakcji białkowej .....	35
4.7.2. Izolacja frakcji membranowej i cytoplazmatycznej.....	35
4.8.Western Blot .....	36
4.8.1. Elektroforeza SDS-PAGE i transfer białek na membranę .....	36
4.8.2. Detekcja białek.....	36
4.9.Transdukcja linii komórkowej C-4I.....	37
4.10.Tworzenie konstruktów genowych GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 .....	38
4.11.Protokół mutagenyzy miejscowo specyficznej .....	39
4.12.Transformacja bakterii kompetentnych.....	41
4.13.Produkcja wektorów wirusowych .....	41
4.15.Transdukcja linii komórkowej HTB-35 .....	43
4.16.Analiza statystyczna.....	43
5. Wyniki.....	44
5.1.Charakterystyka modelu badawczego na poziomie komórkowym i molekularnym .....	45

---

5.1.1. Morfologia i charakterystyka wzrostu linii komórkowych RSM.....	45
5.1.2. Ekspresja kinazy AMPK w komórkach RSM.....	47
5.1.3. Ekspresja transporterów glukozy GLUT-1 i GLUT-4 w komórkach RSM.....	49
5.1.4. Ekspresja podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1 w materiale klinicznym.....	51
5.2. Uzyskanie linii komórkowej o podwyższonej ekspresji AMPK $\alpha$ .....	52
5.2.1. Weryfikacja sekwencji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1.....	52
5.2.2. Wprowadzenie sekwencji flankujących sekwencję PRKAA1.....	54
5.2.3. Uzyskanie konstruktu genowego GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1.....	55
5.2.4. Weryfikacja poprawności sekwencji uzyskanego konstruktu GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1.....	56
5.2.5. Mutageneza miejscowo specyficzna.....	57
5.2.6. Weryfikacja poprawności sekwencji konstruktu genowego GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 po mutagenezie miejscowo specyficznej.....	58
5.2.7. Uzyskanie plazmidu ekspresyjnego zawierającego konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1.....	59
5.2.8. Weryfikacja funkcjonalna uzyskanego plazmidu zawierającego konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1.....	60
5.2.9. Produkcja cząstek lentiwirusowych służących do wprowadzenia trwałej nadekspresji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1.....	62
5.2.10. Transdukcja linii HTB-35 wyprodukowanym lentiwirusem.....	63
5.2.11. Sortowanie modyfikowanych linii komórkowych HTB-35.....	64
5.2.12. Weryfikacja uzyskania podwyższonej ekspresji podjednostki katalitycznej $\alpha$ 1 kinazy AMPK.....	66
5.3. Uzyskanie linii komórkowej o obniżonej ekspresji podjednostki a kinazy AMPK.....	68
5.3.1. Transdukcja linii komórkowej C-4I wirusem wyciszającym AMPK $\alpha$ .....	68
5.3.2. Transdukcja linii komórkowej C-4I wirusem wyciszającym AMPK $\alpha$ 1.....	70
5.4. Wpływ zmian w ekspresji i aktywacji podjednostki katalitycznej $\alpha$ kinazy AMPK na ekspresję markerów związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym.....	72
5.4.1. Proliferacja zmodyfikowanych linii komórkowych RSM.....	72
5.4.2. Zużycie tlenu przez komórki RSM.....	73
5.4.3. Właściwości molekularne komórek HTB-35 o podwyższonej ekspresji AMPK $\alpha$ 1.....	74
5.4.4. Markery molekularne przejścia epithelialno-mezenchymalnego w komórkach RSM.....	76
5.5. Wpływ czynników związanych z EMT na ekspresję i aktywację AMPK.....	77
5.5.1. Zmiany fenotypowe i molekularne w komórkowej C-4I pod wpływem stymulacji czynnikami HGF i SDF-1.....	78
5.5.2. Wpływ czynnika HGF na ekspresję i aktywację AMPK $\alpha$ w komórkach RSM.....	79
5.5.3. Wpływ długotrwałej aktywacji AMPK na żywotność komórek RSM.....	83
5.6. Wpływ zmian w ekspresji kinazy AMPK na zdolność komórek nowotworowych do tworzenia guzów i przerzutowania w modelu mysim NOD-SCID.....	83
5.6.1. Wzrost guzów z komórek linii C-4I.....	83
5.6.2. Zdolność komórek linii C-4I do tworzenia przerzutów.....	84

---

5.6.3. Wzrost guzów z komórek linii HTB-35 .....	85
5.6.4. Zdolność komórek linii HTB-35 do tworzenia przerzutów .....	85
6. Dyskusja .....	87
6.1. Ekspresja i aktywacja AMPK w różnych stopniach zaawansowania nowotworu .....	88
6.2. Wpływ ekspresji AMPK na proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego i przerzutowanie .....	90
6.1. Molekularne mechanizmy wzajemnej regulacji EMT i AMPK .....	93
7. Wnioski .....	97
8. Literatura .....	100

Wykaz stosowanych skrótów:

ATP – adenozy-no-5'-trifosforan

AMP – adenozy-no-5'-monofosforan

AMPK – kinaza aktywowana AMP, ang.: AMP-activated kinase

HPV - wirus brodawczaka ludzkiego, ang.: *human papiloma virus*

RSM - rak szyjki macicy

EMT - przejście epitelialno-mezenchymalne, ang.: *epithelial-mesenchymal transition*

MET - przejście mezenchymalno-epitelialne, ang.: *mesenchymal-epithelial transition*

HGF - czynnik wzrostu hepatocytów, ang.: *Hepatocyte growth factor*

PBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej, ang.: *phosphate buffered saline*

FBS - surowica bydlęca, ang.: *fetal bovine serum*

BSA - albumina bydlęca, ang.: *bovine serum albumine*

EMEM - medium hodowlane, ang.: *Eagle's minimal essential medium*

DMEM - medium hodowlane, ang.: *Dulbecco's modified eagle medium*

PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy, ang.: *polymerase chain reaction*

RNA - kwas rybonukleinowy, ang.: *ribonucleic acid*

DNA - kwas dezoksyrybonukleinowy, ang.: *deoxiribonucleic acid*

NOD-SCID myszy cukrzycowe bez objawów otyłości z wrodzonym defektem odporności typu komórkowego, ang.: *non obese diabetic severe combined immunodeficiency*

# 1. Streszczenie

---

Rak szyjki macicy (RSM) jest czwartym co do częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet. Śmiertelność w przypadku RSM dotyczy przede wszystkim krajów rozwijających się i jest szczególnie częsta wśród kobiet o niskim statusie socjoekonomicznym. Przyczyną tego stanu rzeczy jest późna wykrywalność choroby, co wiąże się z brakiem efektywnych terapii antynowotworowych przy wysokim zaawansowaniu nowotworu. W tym kontekście, badania nad mechanizmami prowadzącymi do progresji nowotworu, stanowią nadzieję na odkrycie nowych celów terapeutycznych. Jednym z obiecujących obszarów badań jest kontekst metaboliczny i wiążący się z nim enzym kinaza aktywowana AMP czyli AMPK.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie roli kinazy AMPK w regulacji procesu przerzutowania komórek nowotworowych raka szyjki macicy.

Ponieważ jednym z mechanizmów umożliwiających przerzutowanie komórek nowotworowych jest proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT), jako model badawczy wykorzystano linie komórkowe, które pod względem molekularnym dobrze przedstawiają ten proces. W wykorzystywanych liniach komórkowych dokonano modyfikacji genetycznych, które zmieniły ekspresję podjednostki katalitycznej kinazy AMPK. Linie RSM inkubowano z czynnikami związanymi z indukcją EMT, a także z farmakologicznymi aktywatorami AMPK.

Wykazano, że progresja nowotworu prowadzi do deregulacji metabolicznej wyrażającej się wyciszeniem ekspresji i aktywności AMPK. Dowiedziono również, że kinaza AMPK jest powiązana ze zdolnością komórek do nabywania fenotypu inwazyjnego w procesie EMT oraz z potencjałem do tworzenia przerzutów w modelu *in vivo*, a jej aktywność może te procesy powstrzymywać.

Podsumowując, kinaza AMPK może być obiecującym celem terapeutycznym, a wprowadzenie do terapii antynowotworowej aktywatorów AMPK może pomóc w skutecznym leczeniu choroby nowotworowej.

Cervical cancer (CC) is the fourth most common malignant cancer among women. Mortality from CC mostly occurs in developing countries and is particularly prevalent among women with low socioeconomic status. The reason for this is the late detection of the disease, which is associated with the lack of effective anticancer therapies at high tumor progression. Due to this fact, research of mechanisms leading to cancer progression is a hope for the discovery of new therapeutic goals. One of the promising areas of research is the metabolic context and the enzyme AMPK activated kinase.

The aim of this dissertation was to investigate the role of AMPK kinase in the regulation of neoplastic cell metastasis in cervical cancer.

Since the epithelial mesenchymal transition (EMT) is one of the mechanisms enabling cancer cell metastasis, cell lines, which molecularly well represent this process, have been used as a research model. In the cell lines used, genetic modifications were made that changed the expression of the AMPK kinase catalytic subunit  $\alpha$ . CC lines were incubated with factors related to EMT induction and with pharmacological AMPK activators.

It was shown that tumor progression leads to metabolic deregulation which is the phenomenon of silencing the expression and activity of AMPK. It has also been demonstrated that AMPK kinase is related to the ability of cells to acquire invasive phenotype in EMT and to the potential for *in vivo* metastases, and its activity may inhibit these processes.

In conclusion, AMPK kinase may be a promising therapeutic target and the introduction of AMPK activators into anti-cancer therapy may help in the effective treatment of cancer.



## 2. Wstep

---

---

## 2.1. Deregulacja metaboliczna w procesach nowotworowych

Funkcjonowanie wszystkich organizmów żywych zależy bezpośrednio od ich zdolności do pozyskiwania i konsumpcji energii. To stwierdzenie jest prawidłowe zarówno dla najprostszych organizmów jednokomórkowych, jak też najwyższej uorganizowanych form życia. Rozpatrując organizmy wielokomórkowe można analizować tę zdolność na poziomie całego organizmu jak i pojedynczych komórek, z których każda niezależnie musi mieć zapewniony dostęp do składników odżywczych i mieć możliwość generowania z nich energii. Komórki w organizmach złożonych bardzo ściśle regulują swój metabolizm energetyczny, a rozprężenie tej kontroli często wiąże się z powstawaniem zmian patologicznych w organizmie [1]. Liczne badania dowiodły, że proces nowotworzenia jest związany z przeprogramowaniem metabolizmu komórkowego jako bezpośredniej i pośredniej konsekwencji zmian w ekspresji genów w wyniku onkogennych mutacji, aktywacji protoonkogenów i inaktywacji genów supresorowych [2]. Wspólną cechą metabolizmu wszystkich komórek nowotworowych jest zdolność do pozyskiwania niezbędnych składników odżywczych ze środowiska, w którym często występują niedobory składników odżywczych i wykorzystywania tych składników odżywczych do ciągłego wzrostu biomasy nowotworowej [3]. Zmiany towarzyszące reprogramowaniu metabolicznemu komórek nowotworowych mają kluczowy wpływ na replikację komórek, ich różnicowanie i tworzenie mikrośrodowiska właściwego dla rozwoju guza [4]. Pierwsze obserwacje dotyczące zmian metabolicznych, które są charakterystyczne dla nowotworów, zostały poczynione prawie sto lat temu, dziedzina badań nad metabolizmem nowotworów w ostatniej dekadzie ponownie znalazła się w centrum zainteresowania naukowców.

Podstawowym źródłem energii dla komórek jest glukoza, która pozwala na pozyskanie energii w postaci cząsteczek ATP. Jest to proces kluczowy do podtrzymania życia we wszystkich komórkach eukariotycznych, a produktem końcowym może być mleczan lub dwutlenek węgla przy pełnym utlenieniu cząsteczki glukozy. Należy podkreślić, że to właśnie pełne utlenienie glukozy w następujących po sobie procesach glikolizy, cyklu kwasu cytrynowego i mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów, jest najefektywniejszym sposobem wytwarzania energii przez komórkę, przy zysku netto około 30 moli cząsteczek ATP na każdy 1 mol glukozy [5]. Glikoliza zachodzi na terenie cytoplazmy komórki, natomiast kolejne etapy w mitochondriach. Tym niemniej, komórki

eukariotyczne, w przypadku niedostatku tlenu potrafią generować energię w procesie glikolizy a następnie beztlenowego przekształcenia pirogronianu do mleczanu, z pominięciem dalszych etapów. Okupione jest to jednak znacznie niższą efektywnością energetyczną, ponieważ z 1 mola glukozy wytwarzane są zaledwie 2 mole ATP. Korzystanie z tego szlaku pozyskiwania energii to w pewnych przypadkach jedyny sposób oddychania komórkowego. Przykładem mogą być tu erytrocyty, które pozbawione są mitochondriów lub komórki mięśni szkieletowych w warunkach niedostatecznego zaopatrzenia w tlen ze strony układu krwionośnego, czyli podczas intensywnego wysiłku. Znany jest fakt wykorzystania oddychania beztlenowego przez komórki nowotworowe, przy wzmożonym pobieraniu glukozy i produkcji znacznych ilości mleczanu, pomimo wystarczającego dostępu tlenu i w pełni funkcjonujących mitochondriów [6].

## 2.2. Efekt Warburga

Historycznie, pierwszym badaczem, który twierdził, że taka zmiana metabolizmu jest nierozdzielnie związana ze wzrostem nowotworu, a wręcz jest powodem jego powstania, był niemiecki biochemik i laureat nagrody nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, Otto Heinrich Warburg [7]. Warburg w 1924 roku wysunął hipotezę, że powstanie, wzrost guza i jego złośliwość są spowodowane tym, że w wyniku upośledzenia zdolności do oddychania tlenowego, komórki zaczynają produkować energię w procesie glikolizy prowadzącej do tworzenia mleczanu [8]. Prowadząc dalsze badania, doszedł jednak do błędnego wniosku, że przyczyną tych zmian są dysfunkcjonalne mitochondria, co w efekcie prowadzi do raka. Samo zjawisko, które zaobserwował, stało się jednak obiektem intensywnych badań, co doprowadziło do zaproponowania przez Efraima Racknera nazwy „efekt Warburga”, która została zaakceptowana w środowisku naukowym [9]. Oczywiście intensywność badań w tej dziedzinie, doprowadziła do zmiany postrzegania tego zjawiska, nie jako przyczyny nowotworu, a raczej efektu transformacji nowotworowej. W miarę rozwoju wiedzy z zakresu onkologii i molekularnych podstaw nowotworzenia, powstawały kolejne teorie, które próbowały wyjaśnić zjawisko występowania „efektu Warburga”. Dowiedziono, że glikoliza w nowotworach jest regulowana przez różne czynniki wzrostowe [6], powiązano także ten efekt z aktywacją protoonkogenów i „wylączeniem” genów supresorowych [10]. Obecnie wiadomo, że

---

wykorzystanie ścieżki beztlenowego rozkładu glukozy jest wykorzystywane przez komórki nowotworowe nie musi oznaczać utraty możliwości oddychania mitochondrialnego, natomiast wykazano, że występowanie „efektu Warburga” jest niezbędne do przeżycia i wzrostu komórek nowotworowych [11]. Zjawisko to jest jednak ciągle przedmiotem intensywnych badań i nie wszystkie jego funkcje zostały poznane.

Wykorzystywanie ścieżki glikolizy przez komórki nowotworowe pomimo, że jest nieefektywnym sposobem pozyskiwania energii, może być jednak jedyną możliwością na przeżycie tych komórek. Trzeba zauważyć, że w warunkach niekontrolowanego wzrostu guza, szybko proliferujące komórki są narażone na hipoksję, szczególnie w wewnętrznych rejonach guza, w rejonach słabo ukrwionych. W takim przypadku beztlenowy rozkład glukozy chroni komórki nowotworowe przed śmiercią [12]. Pojawiły się także dowody, że zwiększone zużycie glukozy podtrzymuje także zwiększone tempo proliferacji [13]. Nadmiar węgla pochodzący z rozkładu glukozy wykorzystywany jest do syntezy *de novo* nukleotydów, aminokwasów i białek [14], [15]. Ponadto zwiększona konsumpcja glukozy może być wykorzystana do syntezy NADPH w szlaku pentozofosforanowym, niezbędnego do biosyntezy innych związków, między innymi lipidów [16]. Hipoteza o wspieraniu biosyntezy poprzez glikolizę jest jednak kontrowersyjna, ponieważ w świetle ostatnich badań proteomicznych, dowiedziono, że aż 10% proteomu jest zaangażowana tylko i wyłącznie w produkcję białek potrzebnych do przeprowadzania glikolizy na taką skalę, jak robią to komórki nowotworowe [17]. Proces glikolizy jest jednak korzystny dla komórek nowotworowych z innego względu, a mianowicie tempo metabolizmu glukozy w tym procesie zachodzi nawet do 100 razy szybciej niż całkowite utlenienie glukozy w mitochondriach, dlatego ilość produkowanego ATP jest porównywalna jak przy tlenowym oddychaniu komórkowym [18], [19]. Dzięki szybkiej produkcji ATP, komórki nowotworowe mogą wygrywać rywalizację z otaczającymi je komórkami stromalnymi i komórkami układu odpornościowego [20]. Zwiększony beztlenowy metabolizm glukozy i związana z tym produkcja mleczanu, prowadzi do zakwaszania mikrośrodowiska rosnącego guza poprzez dyfuzję jonów H<sup>+</sup> w jego otoczeniu. Ostatnio przeprowadzone badania wykazały, że prowadzi to do moderacji aktywności komórek układu odpornościowego, m.in. makrofagów TAM i limfocytów TIL naciekających guz [21], [22]. Jeszcze inne doniesienia pozwalają na powiązanie efektu Warburga z sygnalizacją wewnątrzkomórkową i transdukcją sygnału [23]. Przykładem takiego oddziaływania jest bezpośredni wpływ glikolizy na generowanie

reaktywnych form tlenu (ROS), które są ważnymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi [24]. Modulacja generowania ROS w komórce nowotworowej w wyniku zwiększonej glikolizy może zachodzić poprzez naruszenie równowagi NAD<sup>+</sup>/NADH w mitochondriach [25], a także wspomniane wcześniej zasilanie szlaku pentozofosforanowego w „efekcie Warburga”. Innym aspektem zwiększonego pochłaniania glukozy przez komórki nowotworowe jest modyfikacja acetylacji histonów, co bezpośrednio prowadzi do modyfikacji struktury chromatyny, a w konsekwencji do zmiany ekspresji genów. Nadmierna glikoliza prowadzi do tworzenia zbyt dużej ilości acetylo-CoA, który zwiększa acetylację histonów i w efekcie wprowadza komórki w fazę wzrostu [26].

### 2.3. Historia odkrycia i badań nad AMPK

Historia odkrycia kinazy AMPK sięga lat 70' XX wieku i badań nad aktywnością kinazy białkowej związanej z karboksylazą acetylo-CoA (ACC) i reduktazą HMG-CoA (HMGR), które są, odpowiednio, enzymami regulacyjnymi regulującymi poziom enzymów ograniczających syntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu [27], [28]. Badania prowadzone przez niezależne zespoły badawcze wykazały, że obydwie te enzymy były aktywowane przez adenozymonofosforan (AMP). Dodatkowo, dowiedziono, że fosforylacja kinazy ACC była hamowana przez wysokie stężenie adenozyntroójfosforanu (ATP) i zaproponowano, że jest za to odpowiedzialna inna kinaza, wrażliwa na stosunek ATP do AMP [29]. Kinaza, pierwotnie nazwana kinazą-3 ACC, w 1988 roku po raz pierwszy zastała nazwana jako kinaza aktywowana AMP (ang.: AMP-activated kinase - AMPK), a w 1989 roku, gdy stało się jasne, że jest ona odpowiedzialna nie tylko za fosforylację ACC, ale też HMGR, nazwa ta została przyjęta przez środowisko naukowe [30]. Dalsze badania dowiodły, że AMPK w odpowiedzi na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia AMP przy jednoczesnym spadku ATP, działa jak „przełącznik metaboliczny” wyłączając szlaki anaboliczne a włączając kataboliczne, pozwalające gromadzić energię w postaci ATP [31]. Wkrótce dowiedziono, że aktywność kinazy AMPK może rosnać także niezależnie od stężenia AMP poprzez szlaki metaboliczne związane z jonami Ca<sup>2+</sup>. W tym przypadku za aktywację AMPK odpowiada kinaza kinazy zależnej od kalmoduliny (ang.: calmodulin-dependent kinase kinase – CaMKK), co pozwala określić AMPK także jako komórkowy sensor stresu

metabolicznego [32], [33]. Obecne badania wskazują na zaangażowanie kinazy AMPK w regulacji energetycznej homeostazy komórki i koordynacji wielu szlaków metabolicznych w celu zrównoważenia podaży składników odżywczych z zapotrzebowaniem energetycznym komórki [34], [35]. Ponadto coraz uważniej zaczęto analizować związek pomiędzy AMPK a procesami takimi, jak wzrost i proliferacja komórek, ich migracja i różnicowanie [36], [37], nie tylko w fizjologicznych ale i patologicznych procesach. Aktualnie AMPK jest potencjalnym celem w terapiach związanych z chorobami metabolicznymi, jak cukrzyca typu II, chorobami układu sercowo-naczyniowego, a także chorobami nowotworowymi [38].

#### 2.4. Budowa i struktura AMPK

AMPK jest heterotrimerem, czyli białkiem składającym się z trzech różnych podjednostek:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  [39]. Podjednostka  $\alpha$  jest podjednostką katalityczną – determinuje ona aktywność tej kinazy. Podjednostki  $\beta$  i  $\gamma$  pełnią funkcję regulatorową. Każda z tych podjednostek posiada różne izoformy. Podjednostka katalityczna występuje w dwóch izoformach  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , tak jak i podjednostka  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ). Natomiast podjednostka  $\gamma$  posiada 3 izoformy:  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  i  $\gamma 3$ ; dodatkowo  $\gamma 2$  i  $\gamma 3$  posiadają różne warianty splicingowe, podobnie jak  $\alpha 1$  [40]. Taka różnorodność powoduje, że AMPK może przybrać 12 różnych konfiguracji co ma przełożenie na specyficzność tkankową jak i lokalizację wewnątrzkomórkową [41]. Pomimo, że nie zostały jeszcze zbadane wszystkie funkcje, ani dokładne występowanie każdego z wariantów tej kinazy, można dokonać pewnej charakterystyki występowania poszczególnych izoform podjednostek budujących heterotrimer AMPK. W trzustce, płucach, śledzionie, tkance tłuszczowej i wielu tkankach nabłonkowych występuje ekspresja  $\alpha 1$ , podczas gdy  $\alpha 2$  jest głównie związana z mięśniami szkieletowymi, mięśniem sercowym oraz nerkami [42]. Podjednostka  $\beta 1$ , jest wykrywana w większości tkanek, natomiast  $\beta 2$  w mięśniach szkieletowych, mięśniach gładkich i sercu [43]. Podobnie dla mięśni jest charakterystyczna ekspresja podjednostki  $\gamma 3$ , a  $\gamma 1$  i  $2$  jest obecna w większości tkanek [44].

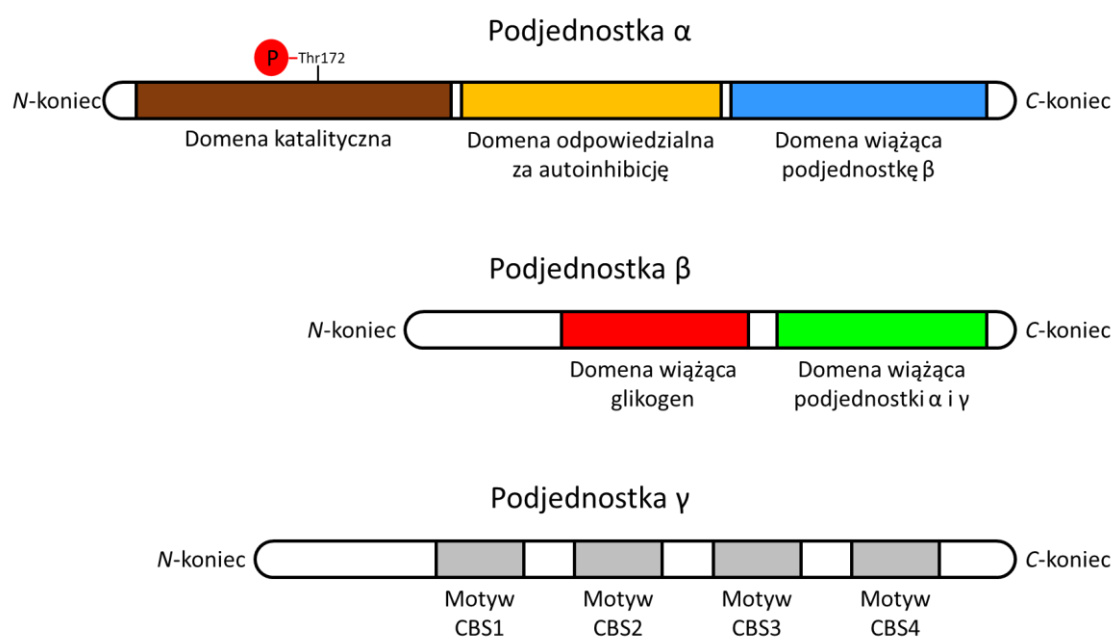
Geny kodujące AMPK zostały oznaczone jako PRKA, jednak żeby rozróżnić poszczególne podjednostki i ich izoformy, dodaje się odpowiedni identyfikator: A1, A2, B1, B2, G1, G2 lub G3. Stąd, przykładowo, gen kodujący podjednostkę  $\alpha 1$ , to PRKAA1,

---

a podjednostkę  $\beta$  – PRKAB1. Geny te są rozmieszczone na pięciu różnych chromosomach 5, 1, 12, 7 i 2 [34].

Główną podjednostką funkcjonalną kompleksu AMPK jest podjednostka katalityczna  $\alpha$ , której masa cząsteczkowa wynosi 63 kDa [45]. W jej sekwencji można wyróżnić serynowo-treoninową kinazową domenę katalityczną (KD), domenę odpowiedzialną za autoinhibicję (AID), a także miejsce wiązania podjednostki  $\beta$ , które znajdują się blisko C-końca tego białka. Schematyczne przedstawienie poszczególnych domen w podjednostkach AMPK przedstawia *Rycina 2-1*. Wysoce konserwatywna sekwencja domeny kinazowej znajduje się na N-końcu podjednostki  $\alpha$  [45]. Najbardziej istotnym miejscem tej domeny jest pierwotne miejsce aktywacji kinazy AMPK, którym jest reszta treoninowa podlegająca fosforylacji, co aktywuje cały kompleks AMPK [46]. Pomimo, że przyjęło się, iż pozycja tej treoniny to 172 (Thr-172), jest to poprawna lokalizacja tylko dla izoformy  $\alpha 2$  o długości 552 aminokwasów, która była odkryta jako pierwsza. Podjednostka  $\alpha 1$  ma długość 559 aminokwasów, a treonina będąca miejscem aktywacji znajduje się w pozycji 183 [39]. Podjednostki  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  pomimo różnej długości, aż w 94% są ze sobą identyczne [34]. Występujące różnice w budowie tych dwóch izoform powodują, że poziom aktywacji AMPK po przyłączeniu cząsteczki AMP jest inny w przypadku  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  [37]. Dodatkowo rodzaj podjednostki  $\alpha$  ma wpływ na wewnątrzkomórkową lokalizację całego kompleksu AMPK – heterotrimer zawierający  $\alpha 1$  lokalizuje się na terenie cytoplazmy, a zbudowany na podjednostce  $\alpha 2$  jest także znajdowany w jądrze [47]. Podjednostka regulatorowa  $\beta$  o masie 30 kDa, w swojej strukturze zawiera domenę wiązania glikogenu (GBD), która bezpośrednio angażuje AMPK metabolizm węglowodanów. W zależności od izoformy  $\beta$ , różne jest powinowactwo AMPK do glikogenu i innych polisacharydów [48]. Na C-końcu podjednostki  $\beta$  znajduje się domena wiążąca podjednostki  $\alpha$  i  $\gamma$ , dlatego to właśnie  $\beta$  jest odpowiedzialna za formowanie całego kompleksu [49]. Poza tym w tej podjednostce na N-końcu znajduje się miejsce podlegające mirystylacji, modyfikacji lipidowej, która zwiększa powinowactwo zmodyfikowanego w ten sposób białka do błon cytoplazmatycznych, a w przypadku AMPK reguluje aktywność całego kompleksu [50]. Najważniejszą podjednostką AMPK pod względem regulacji i koordynacji pracy kompleksu jako wewnątrzkomórkowego sensora energetycznego, jest podjednostka  $\gamma$ , która odpowiada za wykrywanie stężenia AMP i ATP w komórce [51]. Izoforny tej podjednostki najbardziej różnią się od siebie jeśli chodzi o masę cząsteczkową, która

waha się od 38 do 63 kDa, za co odpowiada głównie zmienność długości N-końca [52]. W sekwencji podjednostki  $\gamma$  uwagę zwracają 4 powtórzenia silnie konserwatywnego motywu  $\beta$ -Syntazy cystationinowej (CBS) [53]. Badania wykazały, że w przypadku ludzkiej kinazy AMPK 3 miejsca CBS mają zdolność wiązania AMP, ale dwa z nich mogą również przyłączać ATP [54]. W tym mechanizmie kryje się zdolność funkcjonowania AMPK jako czujnika stężenia ATP i AMP. Co ciekawe, czwarta domena CBS nie wiąże żadnej z cząsteczek energetycznych i pozostaje wolna zarówno w wysokich stężeniach AMP i ATP. Dotychczasowe badania nie wyjaśniły jej roli w funkcjonowaniu kinazy AMPK [55]. Sekwencja 2 i 3 izoformy podjednostki  $\gamma$  oprócz krótkiej domeny wiążącej podjednostkę  $\beta$  (obecnej także w  $\gamma 1$ ), zawiera N-końcową domenę o wysokiej zmienności, której funkcja także nie została wyjaśniona do końca. Pojawiają się jednak doniesienia, że odpowiada ona za modulację fosforylacji Thr-183/Thr-172 w podjednostce katalitycznej  $\alpha$ , a w związku z tym bezpośrednio i istotnie wpływa na aktywność AMPK [56].



Rycina 2-1. Budowa poszczególnych podjednostek składających się na kompleks AMPK.



---

## 2.5. Regulacja AMPK

Kinaza AMPK ma zdolność do autoregulacji swojej aktywności poprzez, wspomnianą już wcześniej, domenę odpowiedzialną za autoinhibicję (AID). Jest to kilkanaście aminokwasów w stronę C-końca od kinazowej domeny katalitycznej w podjednostce  $\alpha$  [57]. Domena AID wchodzi w interakcję z fragmentem zawierającym miejsce katalityczne poprzez wiązania wodorowe [58]. Badania wykazały, że usunięcie tej domeny powodowało konstytutywną aktywację AMPK, a ponadto tak zmodyfikowana kinaza stawała się niewrażliwa na zmiany stężenia AMP [59]. AID powoduje zmianę konformacji pętli aktywacyjnej AMPK – przełączanie ze stanu aktywnego na nieaktywny [58]. Dowiedziono także, że domena AID wraz z występującą w jej sąsiedztwie sekwencją tzw.  $\alpha$ -linkera, są mediatorami przekazania sygnału aktywacji przyłączenia AMP z podjednostki  $\gamma$  na katalityczną  $\alpha$  [60], [61]. Drugim rodzajem autoregulacji jest fragment obecny w podjednostce  $\alpha$  opisywany jako sekwencja pseudo-substratu dla podjednostki  $\gamma$ . Powoduje on ochronę miejsca aktywacji Thr-183/172 przed fosforylacją przez kinazy „upstream” aktywujące AMPK, jednak jego działanie jest znoszone przez rosnące stężenie rzeczywistego substratu, jakim jest AMP. Ten mechanizm jest potrzebny do dodatkowego wyciszania aktywności AMPK w przypadku niskiego stężenia AMP [62].

Kompleks AMPK podlega allosterycznej aktywacji poprzez przyłączenie cząsteczki AMP do miejsca wiązania w podjednostce  $\gamma$ , co powoduje kilkukrotny wzrost aktywności kinazy [63]. Następnym asocjacji cząsteczki AMP jest także zmiana konformacyjna w cząsteczce  $\alpha$ , która chroni miejsce katalityczne Thr-183/172 przed defosforylacją, dzięki czemu możliwa jest akumulacja aktywnej formy AMPK w komórce. W przypadku rosnącego stężenia ATP, cząsteczki te zajmują miejsce wiązania AMP w podjednostce  $\gamma$  odwracając aktywację AMPK [64]. Dowiedziono, że pojawiające się mutacje w domenach CBS podjednostki  $\gamma$  są zasocjowane z niektórymi jednostkami chorobowymi, np. dziedzicznej kardiomiopatii przerostowej [65]. Co interesujące, upośledzenie zdolności  $\gamma$  wiązania cząsteczek energetycznych, powodowało wręcz wzrost aktywności AMPK powodowanej przez fosforylację miejsca Thr-183/172 [66]. Badania nad aktywacją allosteryczną AMPK wykazały także rolę cząsteczek ADP. Nie powodują one bezpośrednio aktywacji AMPK, ale obecność cząsteczek ADP w miejscach wiązania podjednostki  $\gamma$ , chroni miejsce Thr-183/172 przed defosforylacją [67].

Właściwa aktywacja AMPK polega na fosforylacji Thr-183/172, będącej centrum aktywacyjnym podjednostki katalitycznej  $\alpha$ . Ten odwracalny proces jest indukowany przez kinazy „upstream”, czyli aktywujące kinazę AMPK, spośród których jako kluczowe można wymienić kinazę LKB1, kinazę kinazy zależnej od kalmoduliny (CaMKK) oraz kinazę aktywowaną transformującym czynnikiem wzrostu  $\beta$  (TAK1) [68]. Fosforylacja Thr-183/172 w połączeniu z allosteryczną zmianą konformacji spowodowaną przyłączeniem cząsteczki AMP powoduje ponad tysiąckrotny wzrost aktywności kompleksu AMPK [69]. Kinaza LKB1 (ang.: Liver Kinase B1), znana także jako STK11 (ang.: Serine/Threonine Kinase 11) jest znanym i wielokrotnie opisywanym antyonkogenem, którego deficyt jest skorelowany z syndromem Peutza-Jeghersa – dziedziczną skłonnością do powstawania nowotworów, w tym nowotworów złośliwych [70]. Aktywacja AMPK przez LKB1 jest konstytutywna i nie zależy od obecności AMP, jakkolwiek podlega pewnym regulacjom związanym ze zmianami w kolokalizacji tych kinaz. Odpowiedzialne za to enzymy to deacetylaza SIRT1 i kinaza FYN, które wpływają na wewnątrzkomórkową dystrybucję kinazy LKB1 poprzez translokację do jądra (SIRT1) [71] lub eksport z jądra do cytoplazmy (FYN) przy jednoczesnej fosforylacji miejsc aktywacyjnych LKB1 [72]. Bezpośrednia regulacja AMPK przez CaMKK ma z kolei związek ze wewnątrzkomórkowym stężeniem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , a sama aktywacja AMPK jest niezależna od stężenia cząsteczek energetycznych AMP i ATP [73], [74]. Stosunkowo niewiele natomiast wiadomo o kontekście aktywacji AMPK przez kinazę TAK1, jakkolwiek kinaza ta bezpośrednio związana jest transformującym czynnikiem wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [75], [76]. Ponieważ TGF- $\beta$  jest jednym z induktorów przejścia epiteliano-mezenchymalnego, pozwala to spekulować o zaangażowaniu tego szlaku w transformację nowotworową i progresję przerzutową nowotworów [77].

Regulacja funkcjonowania AMPK zachodzi również poprzez fosforylację innych aminokwasów w podjednostkach  $\alpha$  i  $\beta$ , jednak niewiele wiadomo o fizjologicznym znaczeniu tych modyfikacji [78]. Pewne przesłanki pozwalają powiązać poszczególne miejsca, jak np. Ser-487 w podjednostce  $\alpha$ , z mechanizmami obecnymi w komórkach nowotworowych. Fosforylacja wymienionej seryny przez kinazę AKT prowadzi do hamowania interakcji pomiędzy LKB1 a AMPK, a w konsekwencji wyłączenie mechanizmu odpowiedzialnego za inhibicję proliferacji komórek nowotworowych [79], [80].

---

Opisana aktywacja AMPK w procesie fosforylacji miejsca aktywacji Thr-183/172, jest procesem odwracalnym, za co odpowiadają fosfatazy, które usuwając grupę fosforanową z tego aminokwasu, obniżają aktywność AMPK [63]. Znane są przynajmniej dwie istotne fosfatazy defosforylujące miejsce Thr-183/172 a mianowicie PP2A i PP2C, chociaż obecny stan wiedzy nie pozwala na pełne opisanie mechanizmu ich działania jak i metabolicznych warunków w których ich działanie występuje [81]

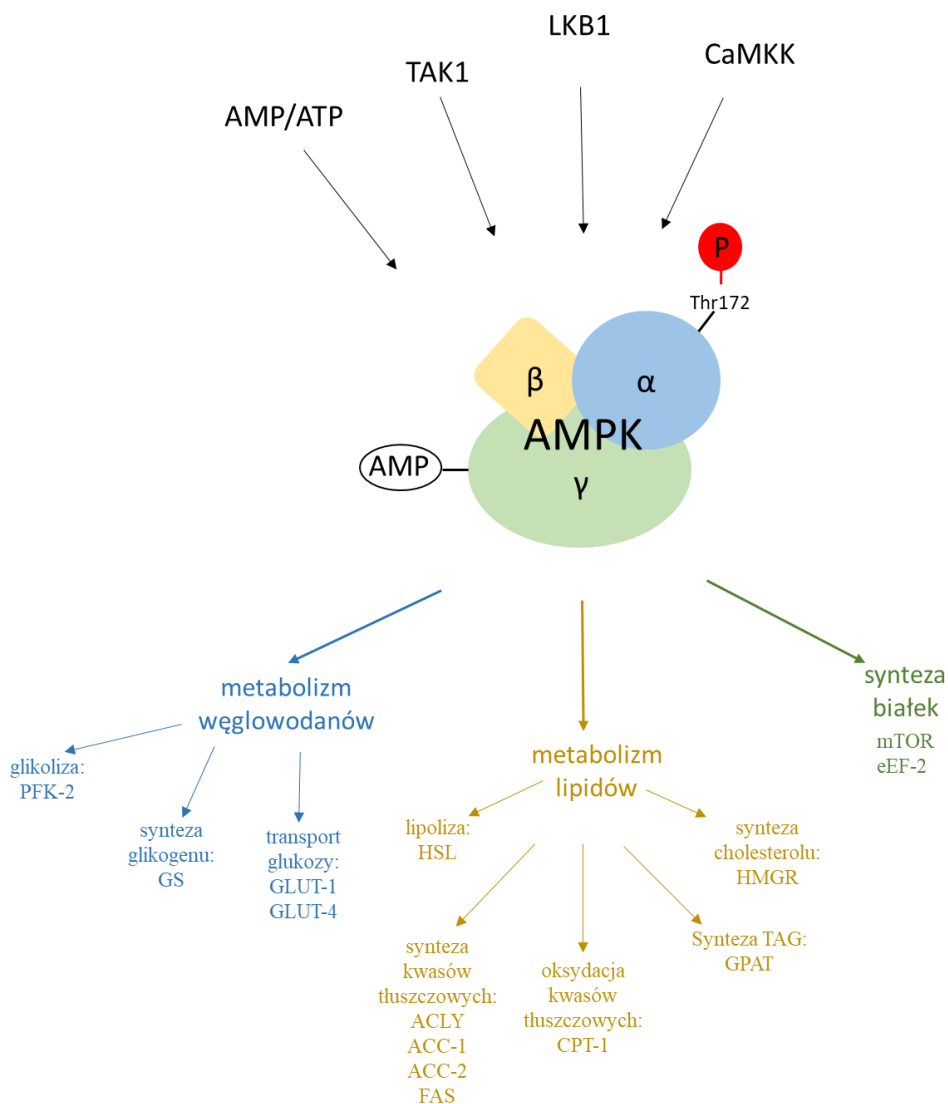
## 2.6. Funkcje AMPK

AMPK jako czujnik homeostazy energetycznej komórki koordynuje pracę wielu szlaków metabolicznych. Zdolność AMPK do „przełączenia” komórki ze stanu wydatkowania na gromadzenie energii, wymaga tego, aby AMPK mogła modulować takie procesy jak metabolizm węglowodanów i lipidów, procesy biosyntezy, autofagii oraz cykl komórkowy [35].

Regulacja metabolizmu węglowodanów przez AMPK odbywa się głównie poprzez zwiększenie wychwytu glukozy przez komórkę [82]. Odpowiada za to powodowana przez AMPK translokacja transportera glukozy GLUT (w szczególności GLUT-4) z cytoplazmy do błony plazmatycznej komórki w odpowiedzi na stres metaboliczny lub inne czynniki (ćwiczenia, działanie czynników farmakologicznych) [83]. AMPK oprócz translokacji, zwiększa także ekspresję tego transportera glukozy, podobnie jak GLUT-1 [84]. Co istotne, aktywacja AMPK przez ćwiczenia lub farmakologiczne aktywatory (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside – AICAR oraz metformina) wpływa na wychwyt glukozy niezależnie od sygnałów związanych z receptorem insuliny [85]. Zostało to wykorzystane w terapii cukrzycy typu 2, ale także pozwala na wykorzystanie AMPK jako celu terapeutycznego w innych jednostkach chorobowych w tym także w chorobach nowotworowych [86]. Dowiedziono, że pewne izoformy fosfofruktokinazy II (PFK II), która bezpośrednio wpływa na regulację glikolizy i glukoneogenezy, są zależne od AMPK, a ponadto, znany jest fakt nadekspresji PFK II w komórkach nowotworowych. Stanowi to przesłankę do zaproponowania terapii antynowotworowej gdzie celem terapeutycznym jest AMPK [87].

Badania naukowe udowodniły także związek AMPK z metabolizmem kwasów tłuszczowych. Wykazano, że aktywacja AMPK powoduje zarówno krótkoterminowe jak i długofalowe skutki w metabolizmie lipidów [88]. Do krótkoterminowego działania AMPK przykładowo zaliczyć można fosforylację kluczowego enzymu dla syntezy lipidów jakim jest karboksylaza acetylokoenzymu-A (ACC-1), co w konsekwencji hamuje syntezę kwasów tłuszczowych [89]. Z kolei długotrwałe efekty aktywacji AMPK, to m.in. wpływ na ekspresję poszczególnych genów odpowiedzialnych za biosyntezę lipidów, cholesterolu i białek [90].

Ponieważ AMPK jest w stanie „przełączyć” metabolizm komórki z konsumpcji na generowanie i gromadzenie zapasów energetycznych w postaci ATP, molekularnymi celami są kluczowe enzymy dla poszczególnych obszarów funkcjonowania komórki, co pokazuje *Rycina 2-2*.



Rycina 2-2. Umiejscowienie AMPK w wewnątrzkomórkowej sieci szlaków metabolicznych. Na górze Ryciny – aktywatory kinazy AMPK, na dole ryciny - główne cele molekularne kinazy AMPK

## 2.7. Rola AMPK w nowotworach i terapiach antynowotworowych

W ostatniej dekadzie kinaza AMPK zaczęła być postrzegana jako istotny cel terapeutyczny dla terapii przeciwnowotworowych. Bezpośrednią przesłanką ku temu, były retrospektywne badania, które wykazały, że w grupie pacjentów chorujących na cukrzycę typu II i leczonych metforminą, która jest farmakologicznym aktywatorem AMPK, odsetek chorób nowotworowych był istotnie niższy, niż w grupie kontrolnej [91]. Ponadto zaobserwowano, że u pacjentów przyjmujących metforminę, a u których

---

wystąpiła choroba nowotworowa, jej przebieg był łagodniejszy, a prawdopodobieństwo remisji – wyższe [91].

Badania *in vitro* potwierdziły potencjał terapeutyczny aktywacji kinazy AMPK w wielu typach nowotworów [92], [93]. Jednakże, trzeba podkreślić, że w zależności od typu nowotworu i stopnia jego rozwoju, AMPK może przyczyniać się do zwiększenia przeżywalności komórek nowotworowych [94]. Ponieważ zarówno komórki wewnątrz rosnącego guza jak i komórki przerzutujące poddawane są różnorodnym stresom metabolicznym takim jak ograniczenie dostępności składników odżywczych, hipoksją i zwiększoną kwasowością mikrośrodowiska, w pewnych warunkach AMPK może być odpowiedzialna za inhibicję apoptozy. Dobrym przykładem jest tu indukowana przez AMPK odporność na apoptozę typu anoikis, czyli związaną z oderwaniem się komórki od błony podstawnej [95].

Znane są przykłady ochronnego działania AMPK w komórkach raka piersi, gdzie enzym ten jest odpowiedzialny za zwiększony wychwyt glukozy i obniżanie toksycznego wpływu reaktywnych form tlenu (ROS) [96]. Z kolei badania nad czerniakiem wykazały obniżanie aktywności AMPK przy jednoczesnym zaburzeniu interakcji pomiędzy LKB1 a AMPK [97]. Inne doniesienia naukowe opisują inhibicję wzrostu komórek nowotworowych *in vitro* i *in vivo* modulowaną przez AMPK [98], [99]. Co ciekawe, wykazały one, że za hamowanie wzrostu guza była odpowiedzialna wyłącznie kinaza AMPK, a nie LKB1, co bezpośrednio pokazuje niezależne działanie AMPK jako antyonkogenu. Jest to tyle istotne, że to właśnie LKB1 jest szeroko opisywana jako inhibitor rozwoju nowotworów.

## 2.8. Mechanizmy molekularne przerzutowania komórek nowotworowych

Przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT) może być opisane jako długotrwałe zmiany morfologiczne i molekularne prowadzące do zmiany charakteru komórki z epithelialnego na mezenchymalny [100]. Podczas tego procesu obserwowane są zmiany w kształcie komórki, jej zdolności do adhezji i migracji. Zjawisko to po raz pierwszy zostało zaobserwowane w rozwoju embrionalnym, gdzie jest integralnym procesem rozwoju tkanek i organów [101]. EMT w embriogenezie może być podzielone na trzy etapy. Początkowa zmiana morfologii oraz przestrzennego ułożenia komórek, poprzedza

zwiększoną produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej i zaburzenie interakcji pomiędzy komórkami a błoną podstawną. Następnie, wskutek proteolitycznej degradacji wiązań z błoną podstawną jak i międzykomórkowych, następuje uwolnienie komórek. Finalnie, komórki przyjmują fenotyp mezenchymalny poprzez rearanżacje cytoszkieletu, ekspresję charakterystycznych markerów molekularnych i nabywają zdolności migracyjnych. W embriogenezie EMT jest kluczowe w procesach gastrulacji, tworzenia mezodermy, a także transformacji komórek neuroektodermy komórki grzebienia neuronalnego [102]. Proces EMT związany jest ze zmianą ekspresji szeregu genów odpowiedzialnych za modyfikacje syntezy białek, morfologii i metabolizmu. Za inicjalizację tego procesu odpowiadają różne czynniki wzrostowe, między innymi transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), epidermalny czynnik wzrostu (EGF), stromalny czynnik wzrostu 1 (SDF-1) czy białka z rodziny Wnt [103]. Cytokiny te wyzwalają aktywację szczególnych genów kodujących czynniki transkrypcyjne (ang: Transcription Factor – TF), które są bezpośrednimi induktorami EMT. Czynniki takie Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, KLF8 czy E47 mogą się bezpośrednio wiązać do promotora genu kodującego kadherynę E – podstawowego białka budującego połączenia pomiędzy komórkami epitelialnymi – i hamować jego ekspresję [104]. Dochodzi również do inhibicji ekspresji innych białek budujących połączenia międzykomórkowe, takich jak desmosomy czy połączenia typu tight-junction [105], aczkolwiek to utrata kadheryny E jest postrzegana jako wyznacznik implementacji programu przejścia epitelialno-mezenchymalnego [106]. Rezultatem wystąpienia EMT jest pojawienie się markerów charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych, takich jak wimentyny, fibronektyny, FSP-1 czy metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania nad EMT, udowodniły, że proces ten jest aktywny w zjawiskach patologicznych jak, włóknienie organów czy progresja przerzutowa nowotworów [107]. EMT podczas metastazy przypomina pod względem molekularnym fizjologiczny proces EMT podczas embriogenezy, aczkolwiek często obserwowane są różnice w wielu typach nowotworów [108]. Trzeba zaznaczyć, że pisywana w przypadku raka piersi czy raka jelita grubego utrata kadheryny E nie jest wymagana do przerzutowania komórek, co zostało między innymi wykazane w badaniach nad rakiem trzustki [109]. Tym niemniej, terapie przeciwnowotworowe celujące w białka indukujące wystąpienie przejścia epitelialno-mezenchymalnego są możliwym kierunkiem przeciwdziałania progresji przerzutowej [110].

---

Ponieważ implementacja EMT i wszystkie wiążące się z nim zmiany molekularne, morfologiczne i metaboliczne niewątpliwie wymagają od komórki wysokiego nakładu energetycznego logiczne jest przypuszczenie o zaangażowaniu AMPK w ten proces. Rzeczywiście w ostatnich latach pojawia się co raz więcej publikacji dotyczących zarówno wpływu AMPK na moderację EMT, jak też modyfikacji aktywności AMPK przez czynniki związane z EMT [111]. Istnieją doniesienia naukowe wykazujące, że aktywacja AMPK w liniach raka piersi i raka prostaty prowadziła do wzrostu ekspresji genu CDH1 kodującego kadherynę E, przy jednoczesnym ograniczeniu ekspresji czynników transkrypcyjnych będących induktorami EMT [112], [113]. Zostało również dowiedzione w badaniach na komórkach raka płuc, że inhibicja AMPK, może prowadzić do przeciwnego efektu – promowania przejścia epitelialno-mezenchymalnego [114]. Jednocześnie, można przedstawić badania, które kwestionują działanie AMPK jako inhibitora EMT. Szerokie badania nad różnymi liniami nowotworowymi (rak jelita grubego, rak trzustki, kostniakomięsak, nie-drobnokomórkowy rak płuc) wykazały, że to LKB1 niezależnie od AMPK była odpowiedzialna za obniżanie poziomu ekspresji induktora EMT jakim jest Snail [115]. Ponadto, niektóre doniesienia dowodzą, że to AMPK jest odpowiedzialna w pewnych warunkach za progresję nowotworu. Zostało to m.in. pokazane na komórkach raka jajnika, gdzie AMPK prowadziła do wzrostu zdolności migracyjnych komórek i nabywania fenotypu migracyjnego [116]. Niedawno zademonstrowano również, że w warunkach hipoksji AMPK indukowała implementację EMT poprzez fosforylację czynnika transkrypcyjnego Twist1, a autorzy zasugerowali, że podobny mechanizm może zachodzić dla innych induktorów EMT [117]

Proces EMT, który umożliwia transformację komórki nowotworowej i jej przeżycie po migracji przez błonę podstawną oraz przedostaniu się do światła naczynia krwionośnego jest pierwszym krokiem do utworzenia przerzutów odległych. Utworzenie guza wtórnego w nowym miejscu z komórek pochodzących z guza pierwotnego, wiąże się z mechanizmem odwrotnym do EMT, czyli przejściem mezenchymalno-epitelialnym (MET) [118]. Podobnie jak EMT, MET jest procesem, który jest istotny podczas rozwoju embrionalnego, szczególnie obserwowany w tworzeniu narządów takich jak nerki, serce czy wątroba [119]. Zaobserwowano także, że jest istotny podczas reprogramowania komórek somatycznych do indukowanych komórek macierzystych (IPS), gdzie czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za reprogramowanie (Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc) indukują



---

ekspresję genów będących markerami komórek epitelialnych, takich jak kadheryna E, kładyny i okładyny [120].

W procesie MET w progresji przerzutowej nowotworu są zaangażowane podobne szlaki sygnałowe jak w EMT, ponieważ pod względem molekularnym stanowią one swoją odwrotność. Zatem ekspresja czynników transkrypcyjnych indukujących EMT, m.in. wymienionych wcześniej Snail, Slug, ZEB, Twist, w przypadku MET będzie obniżana, wpływając na przywracanie fenotypu epitelialnego [121]. Istotnymi czynnikami wzrostowymi w procesie MET są czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), epidermalny czynnik wzrostu (EGF) a także białka z rodziny transformujących czynników wzrostowych (TGF- $\beta$ ), jakimi są białka morfogenetyczne kości (BMP). W mechanizm MET zaangażowany może być także szlak sygnalizacyjny Wnt i  $\beta$ -kateniny [122].

Należy nadmienić, że wymuszona np. farmakologicznie aktywacja MET może być zjawiskiem pożądanym w terapii nowotworowej, jako że ogranicza inwazyjność komórek nowotworowych i ich zdolność do migracji. Przyjmuje się, że komórki podlegające EMT, zyskują plastyczność, a zmiany na poziomie molekularnym powodują utratę wyspecjalizowanego charakteru tkanki epitelialnej. Stąd, indukcja MET pozwala na odzyskiwanie właściwości komórek wyspecjalizowanych – wyróżnicowanych do fenotypu właściwego tkance epitelialnej. Działania takie nazwano „differentiation therapy”, gdzie administracja związków chemicznych (np. forskolina, toksyna cholery) do komórek nowotworach wyzwała różnicowanie słabo wyspecjalizowanych komórek rakowych do prawidłowej tkanki, co wiąże się z obniżeniem ich zdolności do migracji i przerzutowania [123].

Konkludując, dzisiejszy stan wiedzy nie pozwala niestety jednoznacznie określić roli AMPK w chorobach nowotworowych, często określając AMPK jako „miecz obosieczny”, którego działanie zależy od kontekstu metabolicznego [124], [125]. Tym bardziej istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań w tej dziedzinie w celu odkrycia natury AMPK w nowotworzeniu i progresji przerzutowej.

---

## 2.9. Rak szyjki macicy

Rak szyjki macicy (RSM) jest czwartym co do częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet. Według danych WHO za 2018 rok zdiagnozowano 570 tysięcy nowych przypadków tego nowotworu na świecie [126]. Śmiertelność w przypadku RSM dotyczy przede wszystkim krajów rozwijających się i jest szczególnie częsta wśród kobiet o niskim statusie socjoekonomicznym. Dane zebrane w Polsce za lata 2005-2013 w ramach projektu Krajowy Rejestr Nowotworów wskazują na stopniowy spadek zachorowalności na RSM, jednak odsetek nowych incydentów RSM w przeliczeniu na 100 tysięcy populacji kobiet oscyluje w granicach 14 – 15% [127]. Istotnym czynnikiem przyczyniającym się do wzrostu śmiertelności jest słaba wykrywalność i późna diagnoza choroby nowotworowej. Wczesne stadia choroby są stosunkowo łatwo wyleczalne przy wykorzystaniu konwencjonalnych terapii, jak chemioterapia i radioterapia, jednak szanse 5-letniego przeżycia dramatycznie spadają w przypadku wykrycia RSM w zaawansowanym stadium z obecnymi przerzutami dystalnymi [128].

Rak szyjki macicy można podzielić na kilka typów na podstawie badań histopatologicznych pobranych wycinków guza. Rak płaskonabłonkowy (*squamous carcinoma*) jest diagnozowany w około 80% przypadków RSM, co czyni go najczęściej występującym typem tego nowotworu. Jest on uznawany za typ RSM charakteryzujący się najlepszymi rokowaniami, jako że we wczesnych stopniach zaawansowania 5-letnie przeżycia wynoszą ponad 75% [129]. Rak gruczołowy (*adenocarcinoma*) jest rzadziej występującym typem nowotworu, ponieważ jest diagnozowany w około 15% przypadków, natomiast rokowania w przypadku tego rodzaju RSM są gorsze niż w przypadku typu płaskonabłonkowego – 5-letnia przeżywalność wynosi poniżej 70% we wczesnych stopniach zaawansowania [129]. Rodzajem RSM o gorszych rokowaniach jest typ mieszany (*adenosquamous carcinoma*), który jednak diagnozowany jest w zaledwie w około 3% przypadków. Złe rokowania wynikają z faktu występowania wczesnych przerzutów odległych w tym typie RSM [130]. Najrzadziej diagnozowanym typem RSM jest rak neuroendokryny (około 1% przypadków) [131]

Przeżywalność pacjentek z RSM zależy jednak nie tylko od typu tego nowotworu, ale także od stopnia jego złośliwości G (ang.: grading). Na stopień złośliwości mają wpływ takie parametry jak liczba mitoz, polimorfizm jąder komórkowych i stopień rogowacenia komórek. Na podstawie oceny tych cech można wyróżnić raki dobrze

---

zróżnicowane (G1), średnio zróżnicowane (G2), nisko zróżnicowane (G3) i niezróżnicowane (G4) [132].

Przyjmuje się, że głównym czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus brodawczaka ludzkiego HPV (ang. *human papillomavirus*) [133]. Opracowanie szczepionki przeciwko najbardziej onkogennym typom wirusa (przede wszystkim typy 16 i 17, które odpowiadają za 70% wszystkich przypadków RSM) pozwala na skuteczną prewencję zachorowalności na RSM. Trzeba jednak podkreślić, że szczepienia przeciwko HPV muszą być skorelowane z badaniami profilaktycznymi (ang.: screening) które pozwalają na wczesne wykrycie zmian przednowotworowych. Niestety, wysokie współczynniki zachorowalności i umieralności w Polsce wskazują na niedostateczną skuteczność działalności profilaktycznej. Zatem, badania podstawowe nad mechanizmami odpowiedzialnymi za progresję przerzutową raka są ciągle istotne i potrzebne, ponieważ stanowią przyczynek do opracowania bardziej skutecznych terapii zaawansowanych stadiów choroby nowotworowej

## 3. Cele projektu

---

Główny problem badawczy w zakresie pracy doktorskiej, to próba wyjaśnienia roli kinazy aktywowanej AMP (AMPK) w procesie przerzutowania komórek nowotworowych raka szyjki macicy.

Powyższy cel badawczy został osiągnięty poprzez realizację celów szczegółowych:

- Charakterystyka modelu badawczego na poziomie komórkowym i molekularnym
- Modyfikacje genetyczne linii komórkowych w celu zmiany ekspresji podjednostki katalitycznej  $\alpha 1$  kinazy AMPK
  - Wyciszenie ekspresji AMPK $\alpha 1$  w linii komórkowej charakteryzującej się wysoką natywną ekspresją tej podjednostki
  - Uzyskanie zwiększonej ekspresji AMPK $\alpha 1$  w linii komórkowej charakteryzującej się niską natywną ekspresją tej podjednostki
- Określenie wpływu zmian w ekspresji i aktywacji podjednostki katalitycznej  $\alpha 1$  kinazy AMPK na ekspresję markerów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym
- Określenie wpływu czynników związanych z indukcją EMT na ekspresję i aktywację AMPK
- Określenie wpływu zmian w ekspresji kinazy AMPK na zdolność komórek nowotworowych do tworzenia guzów i przerzutowania w modelu mysim NOD-SCID

## 4. Materiały i metody

---

#### 4.1. Hodowle ludzkich linii komórkowych.

Liniami komórkowymi wybranymi do modelu badawczego były ustalone linie komórkowe raka szyjki macicy: C-4I, HTB-35 i HTB-34 (ATCC, USA), które hodowane były w mediach: C-4I - medium WAYMOUTH (Thermo-Fisher Scientific, USA), HTB-35 i HTB-34 - medium EMEM (Lonza, Szwajcaria)). Do mediów dodawano 10% bydlęcej surowicy płodowej - FBS (ang. Fetal Bovine Serum, EURx, Polska) i antybiotyk gentamycynę [50µg/ml] (Lonza, Szwajcaria).

Dodatkowymi hodowanymi komórkami niezwiązanym z modelem badawczym, ale używanymi jako linia pakująca do produkcji wirusa oraz linia używana do mianowania wirusa, były odpowiednio komórki HEK293T oraz HT-1080 (ATCC, USA) Medium hodowlane używane do hodowli tych komórek to DMEM zawierający glukozę w stężeniu 4,5 g/l (Lonza, Szwajcaria) z dodatkiem 10% FBS, gentamycyny oraz 2 mM L-glutaminy (Thermo Fisher Scientific, USA). Medium do produkcji wirusa było dodatkowo suplementowane nie-niezbędnymi aminokwasami (Non-essential amino acids, Thermo Fisher Scientific, USA).

Wszystkie hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i 95% wilgotności. Pasaż komórek wykonywano przy konfluencji nie większej niż 90%. Do pasażu komórek używano 0,25% Trypsyny (Lonza, Szwajcaria), komórki wirowano 200 G, 5 minut w temperaturze pokojowej.

#### 4.2. Chemotaksja

Zdolność komórek do migracji oceniono w teście chemotaktycznym. Jako czynnika wymuszającego kierunek ruchu użyto medium zawierającego 10% FBS. Kontrolą negatywną było medium zawierające 0,5% BSA. Test przeprowadzono w komorach chemotaktycznych Transwell (Corning, USA) zwanych dalej „insertami”.

W celu przeprowadzeniu testu chemotaktycznego, wykonano pasaż komórek C-4I, HTB-35 i HTB-34 - komórki zawieszono w medium hodowlanym uzupełnionym 0,5% BSA i policzono. Komórki zawieszono w medium tak, aby otrzymać  $5 \times 10^4$  komórek/„insert” w 100 µl medium i umieszczono w inkubatorze na godzinę. „Inserty”

---

pokryto żelatyną w ilości 100  $\mu$ l/„insert” i inkubowano 10 min w temp 37°C. Po zebraniu nadmiaru żelatyny i wysuszeniu insertów, dolną komorę płytki wypełniono:

- 650 $\mu$ l podłoża hodowlanego z 0,5% BSA (kontrola negatywna)
- 650 $\mu$ l podłoża hodowlanego z 10% FBS

Komórki dokładnie rozpipetowano, nałożono po 100  $\mu$ l na „insert” i inkubowano 24 godziny w inkubatorze hodowlanym. Po tym czasie komórki barwiono barwnikiem Wrighta, barwienie przzerwano dodając do barwnika Wrighta taką samą objętość buforu do barwienia Wrighta. Bufor przygotowano wg przepisu: 70ml 0,91%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 75ml 0,95%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 855 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Utrwalone komórki, płukanoo dwukrotnie w sterylnej wodzie destylowanej i usunięto mechanicznie komórki z góry „insertu”. Po osuszeniu „insertów” oglądano dolną stronę membrany pod mikroskopem w celu oceny ilości komórek, które przemigrowały na drugą stronę membrany.

#### 4.3. Barwienie immunofluorescencyjne

W celu wizualizacji ekspresji białka transportera glukozy 1 (GLUT-1) wykonano barwienie fluorescencyjne. Barwiono komórki wysiewane na szkiełkach nakrywkowych umieszczanych w dołkach płytki 24-dołkowej. Komórki wysiewano w całkowitej objętości 0,5 ml medium suplementowanego 10% FBS, w ilościach: 1x10<sup>5</sup> komórek C-4I oraz 6x10<sup>4</sup> komórek HTB-35i HTB-34. Po 24 godzinach od wysiania, usunięto medium, a komórki przepłukiwano roztworem PBS. Następnie komórki utrwalano 20 minut w temperaturze pokojowej 4% roztworem paraformaldehydu, po czym przepłukano trzykrotnie utrwalone komórki roztworem PBS. Po odplukaniu paraformaldehydu, komórki permabilizowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej 0,1% roztworem Tritonu X-100 w PBS i po raz kolejny trzykrotnie przepłukano roztworem PBS. Tak przygotowane komórki poddano blokowaniu niespecyficznego wiązania przeciwciał przez wykonanie 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej w 3% roztworze BSA w PBS (tzw. bufor blokujący). Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym anty-GLUT-1 (sc-377228, Santa Cruz Biotechnology, USA) rozcieńczonym w 3% roztworem BSA w PBS przez około 16 godzin w temperaturze 4°C. Po inkubacji z przeciwciałem I-rzędowym, komórki



przepłukiwano trzykrotnie roztworem PBS, a następnie wykonano inkubację z przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym z fluorochromem (goat anti-mouse IgGAF488 conjugate, A11001, Thermo Fisher Scientific) rozcieńczonym w buforze blokującym, do którego dodano barwnik Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) w stężeniu 1:1000. Inkubację z przeciwciałem II-rzędowym prowadzono w temperaturze pokojowej w czasie 60 minut, po tym czasie komórki przepłukano trzykrotnie roztworem PBS, a następnie szkiełka nakrywkowe wyjęto z dołków płytki 24-dołkowej i przełożono na mikroskopowe szkiełko podstawowe dodając na szkiełko 100 ul Mounting Medium (Dako, Dania). Tak przygotowane preparaty mikroskopowe analizowano wykorzystując mikroskop fluorescencyjny Olympus BX51. Specyficzność barwienia sprawdzono porównując komórki barwione z kontrolą negatywną (inkubowane wyłącznie z II-rzędowym przeciwciałem).

#### 4.4. Izolacja całkowitego RNA

Izolacja całościowej puli RNA została wykonana za pomocą GeneMATRIX Universal Purification Kit (EURx, Polska) wg wytycznych producenta. Wyizolowane RNA sprawdzono pod kątem uzyskanego stężenia i czystości poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm na spektrofotometrze UV-VIS NanoDrop ONE (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### 4.5. Odwrotna transkrypcja RNA

Reakcja odwrotnej transkrypcji posłużyła do syntezy cDNA wykorzystywanego następnie w analizie ekspresji genów. Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano 1 µg całkowitego RNA oraz 0,5 µM nukleotydów dNTP, 50 ng sześci nukleotydowych losowych starterów, inhibitora RNaz – Rnasin (Promega, USA) oraz 100 jednostek odwrotnej transkryptazy M-MLV H- Point Mutant (Promega, USA). Reakcję prowadzono w termocyklerze SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, USA) w warunkach termicznych zalecanych przez producenta odwrotnej transkryptazy.

## 4.6. PCR w czasie rzeczywistym

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym służyła do oznaczenia ekspresji genów na poziomie transkryptu. Korzystano z zestawu specyficznych sond TaqMan sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym 6- karboksylfluoresceiną FAM (Thermo Fisher Scientific, USA). Wykaz używanych sond zawarto w tabeli 4-1. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystywano zestaw Blank qPCR Master Mix (EURx, Polska) z dodatkiem barwnika pasywnego ROX (EURx, Polska). Jako matrycy używano 100 ng cDNA otrzymanego po reakcji odwrotnej transkrypcji. Ekspresję genów obliczono jako względną ekspresję danego genu względem genu referencyjnego, jakim jest gen dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, ang.: Glycer Aldehyde 3- Phosphate Dehydrogenase) używając metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Nazwa genu	Numer katalogowy	Nazwa genu	Numer katalogowy
PRKAA1	Hs01562315_m1	VIM	Hs00958111_m1
PRKAA2	Hs00178903_m1	GFP	Mr03989638_mr
PRKAB1	Hs00272166_m1	DSP	Hs00950591_m1
PRKAG1	Hs01091629_g1	CLDN1	Hs00221623_m1
SNAI1	Hs00195591_m1	OCLN	Hs00170162_m1
SNAI2	Hs00161904_m1	DES	Hs00157258_m1
CDH1	Hs01023894_m1	MMP-2	Hs00234422_m1
ZEB-1	Hs00232783_m1	ACTB	Hs99999903_m1
MMP-1	Hs00899658_m1	MMP-13	Hs00233992_m1
mGAPDH	Mm99999915_g1	hGAPDH	Hs02786624_g1

Tabela 4-1. Wykaz sond TaqMan używanych do oznaczania ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym

#### 4.7. Izolacja białka

W zależności od potrzeb białko izolowano dwoma różnymi sposobami. Stężenie wyizolowanego białka oznaczano wykorzystując spektrofotometryczną metodę Bradforda – odczyt absorbancji przy długości fali 595 nm. Jako standardów białka używano Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, USA).

##### 4.7.1. Izolacja całkowitej frakcji białkowej

Całkowitą frakcję białkową otrzymano poprzez lizę zebranych komórek roztworem lizującym zawierającym M<sup>-</sup>PER (Thermo Fisher Scientific, USA), kwas etylenodiaminotetraoctowy EDTA [5 mM] (Sigma Aldrich), pirofosforan sodu [10 mM] oraz inhibitory proteinaz i fosfataz (Sigma Aldrich): fluorek sodu [10 mM], ortowanadzan sodu [10 mM], aprotyninę [10 µg/ml], leupeptynę [10 µg/ml], pepstatynę A [10 µg/ml] i PMSF [10 µg/ml]. Zebrane komórki inkubowano w roztworze lizującym 15 minut na lodzie, worteksując 10 sekund co każde 3 minuty. Po zwirowaniu próbek >12000 G przez kolejne 15 minut w 4°C, supernatant przeniesiono do nowych probówek. Tak otrzymane lizaty białkowe były bezpośrednio używane do dalszych oznaczeń lub zamrożone w temperaturze -80°C. Lizaty te były wykorzystywane do oznaczenia ekspresji na poziomie białka, a także stopnia fosforylacji w przypadku AMPK $\alpha$  i AMPK $\beta$ 1.

##### 4.7.2. Izolacja frakcji membranowej i cytoplazmatycznej

W celu ustalenia w komórkach RSM lokalizacji białek transporterów glukozy (GLUT-1 i GLUT-1) frakcje membranową i cytoplazmatyczną izolowano za pomocą kitu ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, USA), zgodnie z zaleceniami producenta.

---

#### 4.8. Western Blot

Metodą Western Blot oceniano ekspresję i aktywację wybranych białek.

##### 4.8.1. Elektroforeza SDS-PAGE i transfer białek na membranę

Elektroforetycznemu rozdzielaniu metodą SDS-PAGE były poddawane próbki zawierające 30 µg białka z dodatkiem czynnika redukującego Bond Breaker (Thermo Fisher Scientific, USA) oraz buforu obciążającego NuPage LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, USA). Zdenaturowane próbki (72°C, 5 minut) nakładano na 12% żel poliakrylamidowy i rozdzielano przy napięciu 120V przez 100 minut. Po rozdzielaniu elektroforetycznym transferowano białka na membranę PVDF (BioRad, USA) metodą transferu „mokrego” przez 60 minut prądem o napięciu 100V.

##### 4.8.2. Detekcja białek

W celu detekcji białek po transferze, przepłukano membranę PVDF w buforze TBST, a następnie wykonano blokowanie niespecyficznych wiązań poprzez godziną inkubację w 1% roztworze BSA w TBST. Kolejnym krokiem było dodanie odpowiedniego przeciwciała pierwszorzędowego i całonocna inkubacja. Wykaz używanych przeciwciał przedstawiono w *Tabeli 4-2*. Przeciwciało anti-GAPDH było używane jako kontrola nałożenia. Po inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym, membrany płukano w TBST trzykrotnie po 15 minut, a następnie inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP, ang.: horseradish peroxidase). Specyficzny sygnał uzyskano wykorzystując substrat dla HRP: ECL Reagent (Thermo Fisher Scientific). Sygnał chemiluminescencji był odczytywany za pomocą urządzenia obrazującego Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak, USA).

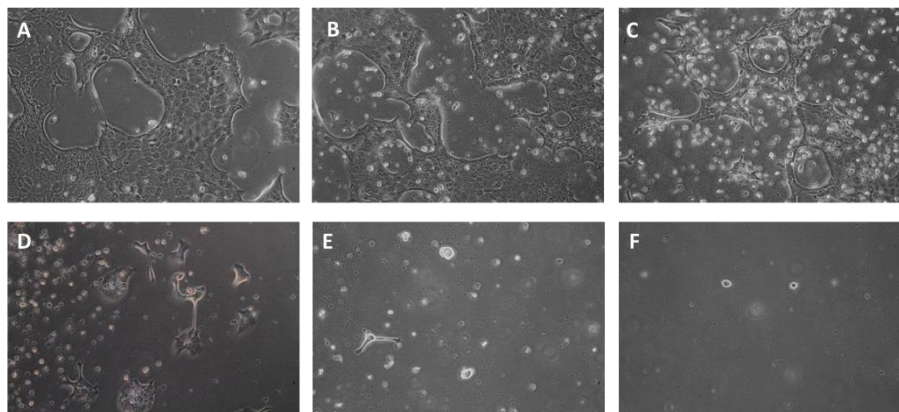
Nazwa przeciwciała	Producent	Numer katalogowy
AMPK $\alpha$	Cell Signaling	#2793
Phospho-AMPK $\alpha$	Cell Signaling	#4188
AMPK $\beta$ 1	Cell Signaling	#4178
Phospho-AMPK $\beta$ 1	Cell Signaling	#4186
GLUT-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-377228
GLUT-4	Sigma-Aldrich	G4173
GFP	Cell Signaling	#2955
GAPDH	Cell Signaling	#2118
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005

Tabela 4-2. Wykaz przeciwciał używanych do detekcji białek metodą Western Blot.

#### 4.9. Transdukcja linii komórkowej C-4I

W celu uzyskania zmodyfikowanych linii komórkowych C-4I, komórki zostały zainfekowane przy użyciu zakupionych lentiwirusów wprowadzających shRNA przeciwko podjednostce katalitycznej AMPK $\alpha$ 1 oraz, jako kontrolę shRNA niecelujące w żaden znany transkrypt (shRNA typu „scrambled”). Transdukcję przeprowadzono przy użyciu MOI=5 (ang.: Multiplicity of infection) i 6  $\mu$ g/ml polibrenu (Sigma-Aldrich). Selekcję komórek zmodyfikowanych C-4I shCTRL i shAMPK $\alpha$ 1 wykonano przy użyciu antybiotyku selekcyjnego puromycyny (Invivogen, USA) w stężeniu 0,125  $\mu$ g/ml.

Właściwe stężenie antybiotyku wybrano na podstawie wykonanej wcześniej krzywej przeżywalności na komórkach tej linii, co poglądowo przedstawia Rycina 4-1.



Rycina 4-1. Efekt działania antybiotyku selekcyjnego puromycyny na komórki linii C-41 typu dzikiego (WT). Zdjęcia odpowiadają różnym czasom inkubacji komórek z puromycyną w stężeniu 0,125  $\mu\text{g/ml}$ . A – 0 godzin, B – 48 godzin, C – 6 dni, D – 10 dni, E – 13 dni, F – 15 dni

#### 4.10. Tworzenie konstruktów genowych GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1

Konstrukt genowy GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 uzyskano, poprzez reakcje PCR wprowadzające jednocześnie miejsca restrykcyjne i sekwencje rekombinujące (attB) na końcach insertów. Sekwencję białka zielonej fluorescencji (GFP) amplifikowano na matrycy plazmidu pEGFP-C1 (Clontech, USA), sekwencję podjednostki katalitycznej  $\alpha$ 1 kinazy AMPK z plazmidu pDONR223-PRKAA1 [#23871] (Addgene, USA), natomiast P2A z plazmidu FUW-OSKM (Addgene, USA). Każdy amplikon był trawiony odpowiednim enzymem restrykcyjnym i oczyszczany przy użyciu GeneMATRIX DNA Purification Kit (EURx, Polska). Ponadto, fragment GFP był defosforylowany za pomocą Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (EURx) i ligowany z sekwencją P2A, a następnie PRKAA1 w celu uzyskania GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1. Dokonano amplifikacji całego konstruktów za pomocą primerów attB, odpowiednio GFPattB forward (5'-GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTACCATGTGTGAGCAAG-GGCGA) i AMPKattB reverse (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTATTGTGCAAGAATTTT). Oczyszczony produkt był bezpośrednio rekombinowany z wektorem pDONR221, a następnie z wektorem ekspresyjnym

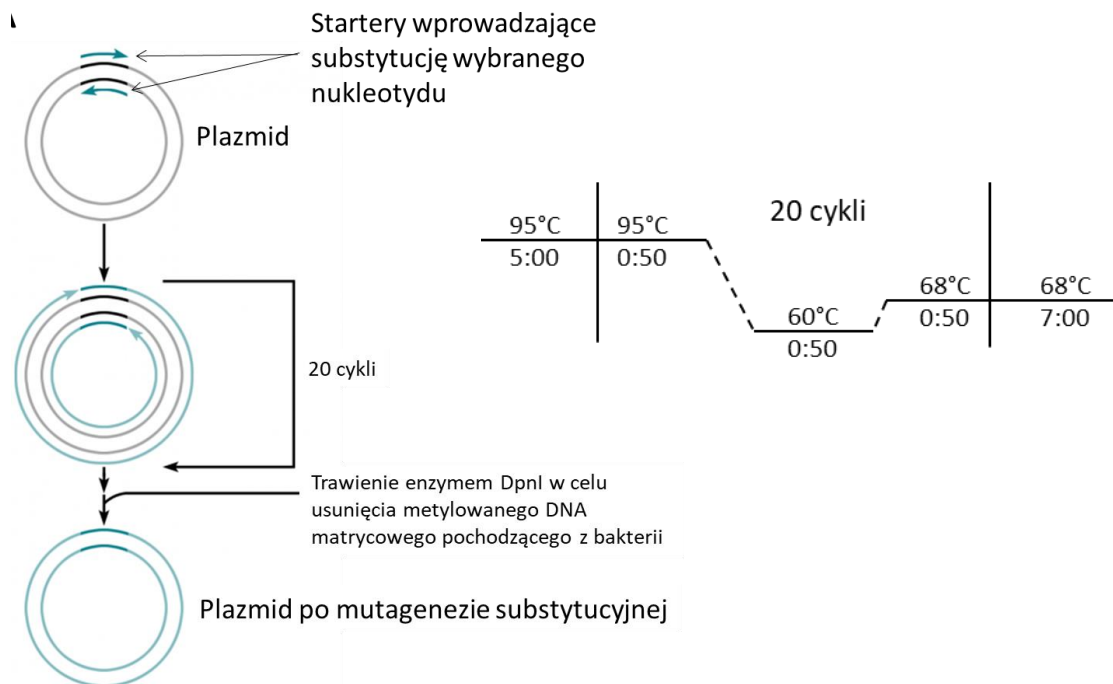
pLenti6/UbC-DEST przy użyciu odpowiednio klonazy BP i LR (Invitrogen, USA). Uzyskane klony zostały zweryfikowane poprzez analizę restrykcyjną i sekwencjonowanie. Jako wektor kontrolny zastosowano GFP@pLenti6/UbC, którego procedura otrzymania była analogiczna z wyżej opisaną (oczywiście z pominięciem etapu ligacji). Schemat konstruktów genowych GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 przedstawia *Rycina 4-2*.



*Rycina 4-2. Schemat konstruktów genowych GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1. Oznaczono trzy sekwencje wchodzące w skład konstruktów połączone miejscami restrykcyjnymi XbaI i EcoRI. Na końcach konstruktów znajdują się sekwencje flankujące attB wymagane do rekombinacji z plazmidem pDONR221.*

#### 4.11. Protokół mutagenyzy miejscowo specyficznej

Zasadę mutagenyzy miejscowo specyficznej przedstawia *Rycina 4-1*. Przeprowadza się reakcję PCR używając starterów o sekwencji komplementarnej względem siebie (przyłączających się do matrycy plazmidowej w tym samym miejscu na obu niciach). Środkowa część sekwencji starterów jest zmieniona względem matrycy – po reakcji w tym miejscu dojdzie do zmiany sekwencji docelowej. Istotne jest, że produkt reakcji PCR nigdy nie jest wykorzystywany jako matryca. Oznacza to, że nie jest to technika amplifikująca, w przeciwieństwie do standardowego PCR, gdzie otrzymuje się wykładniczą amplifikację fragmentu DNA. W tym przypadku otrzymany produkt pozostaje w stosunku 1:1 do ilości użytego plazmidu. Powstają plazmidy „hybrydowe”, które składają się z jednej nici macierzystej (pochodzącej od bakterii) i drugiej – komplementarnie dobudowanej przez polimerazę. Profil temperaturowy reakcji przedstawia *Rycina 4-1*.



Rycina 4-3. Schemat mutageny miejscowo specyficznej oraz profil temperaturowy reakcji PCR

Protokół ten może służyć do insercji, delecji, substytucji pojedynczych nukleotydów lub całych grup nukleotydów. W tym przypadku była to aplikacja substytucji miejscowo specyficznej wybranego nukleotydu (komplementarnej pary nukleotydów). Sekwencje użytych do reakcji starterów są przedstawione poniżej, nukleotydy, które zmieniają sekwencję matrycy zaznaczono nawiasami.

Sekwencje starterów:

Forward: 5' CTTTGTACAAAAAAGTT(G)GCATGGCGACAGCCGAG 3'

Reverse: 5' CTCGGCTGTCGCCATGC(C)AACTTTTTTGTACAAAG 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia *Tabela 4-3*.



Objętość [ $\mu$ l]	Składnik
0,5	starter Forward
0,5	starter Reverse, 2,5 pmol/ $\mu$ l
0,35	mix dNTP 10 mM
1,25	bufor polimerazy, 10x stężony
0,25	polimeraza Phusion (High-fidelity)
1	matryca - DNA plazmidowe, 2 ng/ $\mu$ l
8,75	H <sub>2</sub> O

Tabela 4-3. Skład mieszaniny reakcyjnej używany do przeprowadzenia mutagenезy miejscowo specyficznej.

Po reakcji produkt jest trawiony za pomocą enzymu *DpnI*, który trawi tylko metylowane DNA, a więc DNA pochodzące z bakterii. Z tego powodu degradacji ulegają nici matrycowe plazmidu, a pozostają utworzone *de novo* w reakcji PCR. Po tym kroku przeprowadza się transformację bakterii kompetentnych, a następnie oczyszcza DNA plazmidowe zawierające zmienioną w mutagenезie miejscowo specyficznej sekwencję.

#### 4.12. Transformacja bakterii kompetentnych

Transformację bakterii kompetentnych przeprowadzano metodą szoku termicznego. Procedura obejmowała dodanie do rozmrożonych na lodzie bakterii, 1  $\mu$ l plazmidu (zwykle rozcieńczonego do 2ng/ $\mu$ l). Następnie bakterie inkubowano na lodzie przez 30 minut, po czym zastosowano szok cieplny przez zanurzenie w łaźni wodnej o temperaturze 42 °C przez 30 sekund i umieszczono na lodzie na 2 minuty. Do bakterii dodawano 250  $\mu$ l podłoża wysokoenergetycznego S.O.C. (Thermo Fisher Scientific) i wytrząsano 225 RPM w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę. Następnie wysiewano część mieszaniny (ok 50-100 $\mu$ l) na płytkach agarowych zawierających antybiotyki selekcyjne. Płytki inkubowano przez noc w temperaturze 37 °C.

#### 4.13. Produkcja wektorów wirusowych

Cząsteczki lentiwirusowe były otrzymywane zgodnie z protokołem ViraPower (Thermo Fisher Scientific). Komórki HEK293T były wysiewane na butelce hodowlanej

T75 w ilości  $9 \times 10^6$ . Cztery godziny po wysianiu komórek przeprowadzono transfekcję przy użyciu ortofosforanu wapnia ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Mieszaninę transfekcyjną przygotowano w następujący sposób: 26-39  $\mu\text{g}$  DNA plazmidowego, 65  $\mu\text{l}$  2,5 M  $\text{CaCl}_2$ , 650  $\mu\text{l}$  2x BBS (sól fizjologiczna buforowana BES, pH 7,2) (oba z Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i 585  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Mieszaninę transfekcyjną inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej, a następnie przenoszono na świeże podłoże hodowlane zawierające 25  $\mu\text{M}$  chlorokiny (Sigma-Aldrich, USA). Podłoże zawierające cząstki lentiwirusowe zebrano po 48 i 72 h po transfekcji. Zebrane podłoże było odwirowywane (1750 g, 10 min, 4°C), filtrowane przez filtr o średnicy porów 0,45  $\mu\text{m}$  i zamrażane w temperaturze -80°C. Przygotowano dwie różne mieszaniny transfekcyjne. Plazmid ekspresyjny eGFP@pLenti6/Ubc oraz plazmidy akcesoryjne (kodujące m.in. białka do budowy wirusa): pLP1, pLP2, pVSVG (Thermo Fisher Scientific) wykorzystano do wytworzenia wirusa wprowadzającego zielone białko fluorescencji (GFP). Druga mieszanina zawierała plazmid GFP-P2A-AMPK@pLenti6/Ubc i plazmidy akcesoryjne. W obu mieszkankach użyto tego samego numeru kopii plazmidów ekspresyjnych,  $1,5 \times 10^{12}$ .

#### 4.14. Mianowanie uzyskanych wirusów

W celu określenia miana wyprodukowanych lentiwirusów zainfekowano komórki HT-1080. Cztery godziny przed transdukcją  $5 \times 10^4$  komórek wysiano na płytce 24-dółkowej. Do komórek HT-1080 dodawano różne objętości pobranego podłoża (0,1-100  $\mu\text{l}$ ). Czterdzieści osiem godzin po transdukcji odsetek komórek zmodyfikowanych (wyrażających GFP) oceniano za pomocą cytofluorymetrii – cytometr Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) w celu obliczenia jednostek transdukcyjnych (TU) w 1 ml każdego zebranego podłoża. Uzyskane miana wirusów przedstawia *Tabela 4-4*.

GFP I	GFP II	GFP-P2A-AMPK	GFP-P2A-AMPK
$8,04 \times 10^5$	$3,84 \times 10^5$	$1,76 \times 10^6$	$4,81 \times 10^5$
$6,19 \times 10^5$	$6,38 \times 10^5$	$1,35 \times 10^6$	$3,54 \times 10^5$
$4,50 \times 10^5$	$3,35 \times 10^5$	$7,76 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$
$4,25 \times 10^5$	$2,95 \times 10^5$	$5,29 \times 10^5$	$2,66 \times 10^5$
$2,66 \times 10^5$	$2,03 \times 10^5$	$2,95 \times 10^5$	$1,96 \times 10^5$
<b><math>5,0 \times 10^5</math></b>	<b><math>4,2 \times 10^5</math></b>	<b><math>8,8 \times 10^5</math></b>	<b><math>2,9 \times 10^5</math></b>

Tabela 4-4. Wyniki mianowania wyprodukowanych wirusów w linii komórkowej HT-1080. Wirusy były produkowane w duplikatach.

#### 4.15. Transdukcja linii komórkowej HTB-35

W celu uzyskania zmodyfikowanych linii komórkowych HTB-35, komórki zostały zainfekowane przy użyciu wygenerowanych cząstek lentiwirusowych wprowadzających konstrukt genowy GFP-P2A-AMPK lub tylko gen reporterowy GFP. Transdukcję przeprowadzono przy użyciu MOI=5 (ang.: Multiplicity of infection) i 6  $\mu\text{g/ml}$  polibrenu (Sigma-Aldrich). Selekcję komórek zmodyfikowanych HTB-35 GFP i HTB-35 GFP-P2A-AMPK wykonano przy użyciu antybiotyku selekcyjnego blastycydyny (Invivogen, USA) w stężeniu 6  $\mu\text{g/ml}$ .

Linie komórkowe HTB-35 GFP i HTB-35 GFP-P2A-AMPK sortowano przy użyciu sortera komórkowego FACSAria II (Beckton-Dickinson) w celu usunięcia z populacji komórek odpornych na antybiotyk selekcyjny, a niewykazujący zielonej fluorescencji. Procent zielonych komórek fluorescencyjnych w zmodyfikowanych liniach komórkowych mierzono za pomocą cytometru przepływowego Attune NxT.

#### 4.16. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 5. W przypadku porównywania 2 grup danych zastosowano test t-studenta. Do porównywania wielu grup wykorzystano analizę wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey`a. Analizę dokonano zakładając 95% poziom istotności.

## 5. Wyniki

---

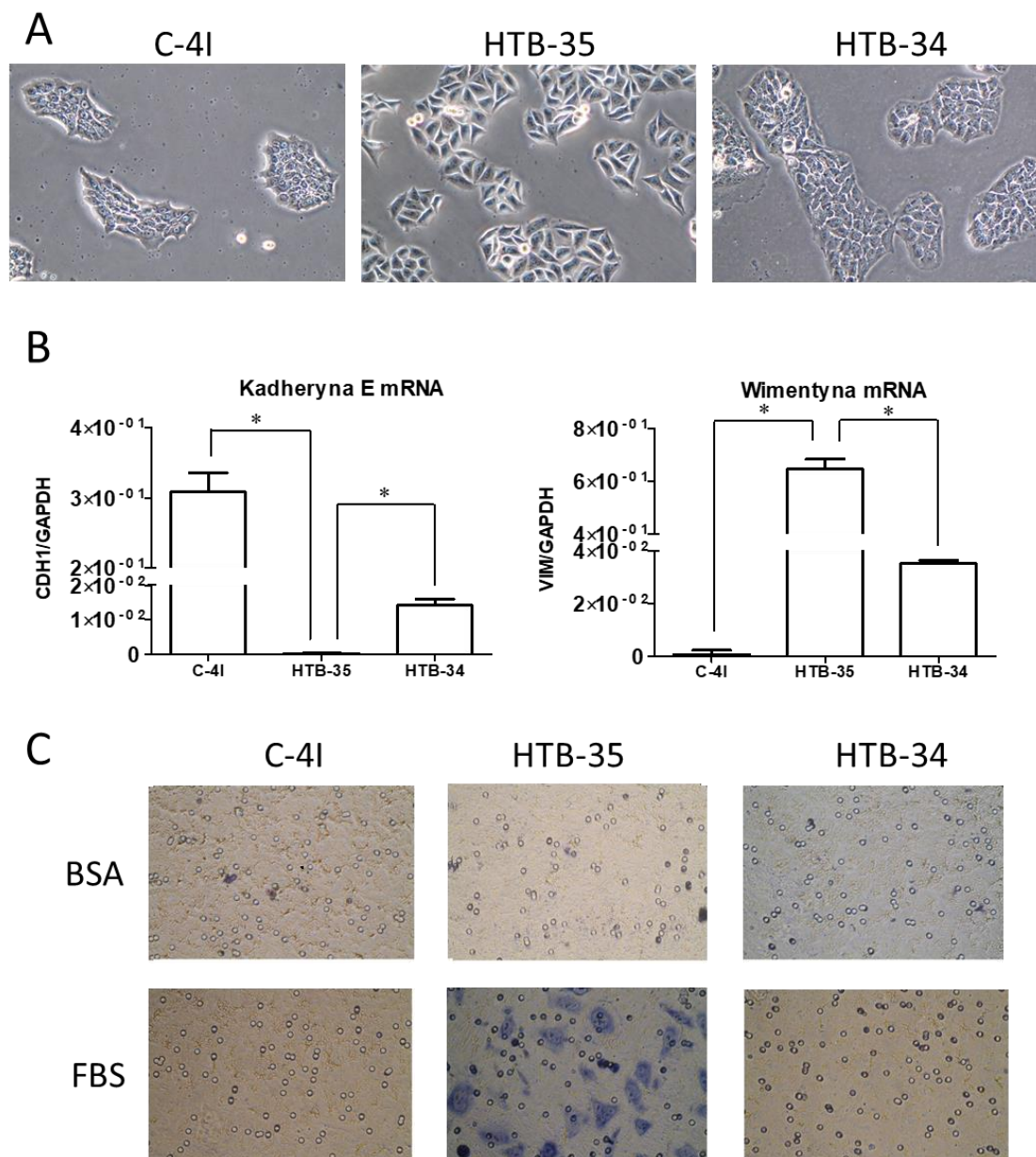
---

## 5.1. Charakterystyka modelu badawczego na poziomie komórkowym i molekularnym

### 5.1.1. Morfologia i charakterystyka wzrostu linii komórkowych RSM

W niniejszej pracy doktorskiej, model badawczy oparto o trzy linie komórkowe RSM przedstawiające różny stopień zaawansowania nowotworu – C-4I, HTB-35 i HTB-34. Wybór linii podporządkowany był ich molekularnym właściwościom, które pozwalają odnieść je do procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego oraz zjawiska odwrotnego, czyli przejścia mezenchymalno-epitelialnego. Z tego powodu, stanowią one dobre przybliżenie mechanizmów będących istotną częścią ogółu zmian zachodzących w czasie przerzutowania nowotworów.

Morfologię komórek w normalnych warunkach wzrostu (37 C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności, media wzrostowe suplementowane 10% bydlęcą surowicą płodową) przedstawia *Rycinia 5-1A*. Obserwowane są zasadnicze różnice w wyglądzie kolonii komórkowych. Komórki C-4I tworzą zwarte kolonie o wyraźnych granicach, a komórki ściśle przylegają do siebie, co jest charakterystyczne dla komórek epitelialnych. W linii komórkowej HTB-35 można zaobserwować, rozluźnienie połączeń międzykomórkowych, w związku z czym kolonie wzrostowe tracą wyraźne granice. Linia HTB-34 pochodząca z guza wtórnego wykazuje odzyskanie bardziej epitelialnej charakterystyki wzrostu, aczkolwiek można doszukiwać się mniejszego upakowania komórek w obrębie kolonii niż w komórkach C-4I. Różnice pomiędzy liniami są obserwowalne również na poziomie molekularnym. Na *Rycinie 5-1B* przedstawiono wyniki oznaczeń głównych markerów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym. Ekspresja Kadheryny E, markera komórek epitelialnych, podczas EMT ulega wyciszeniu, natomiast pojawia się marker komórek mezenchymalnych – Wimentyna. Przy odwrotnym do EMT procesie, czyli przejściu mezenchymalno-epitelialnym, komórki odzyskują swój epitelialny charakter, zatem powraca ekspresja Kadheryny E, a wyciszeniu ulega Wimentyna. Na *Rycinie 5-1C* przedstawiono wyniki testu chemotaksji do FBSu, który wykazał brak zdolności do ruchu ściśle przylegających do siebie komórek C-4I jak i HTB-34. Jediną linią, której komórki mogły migrować przez pory membrany była inwazyjna linia komórkowa HTB-35.

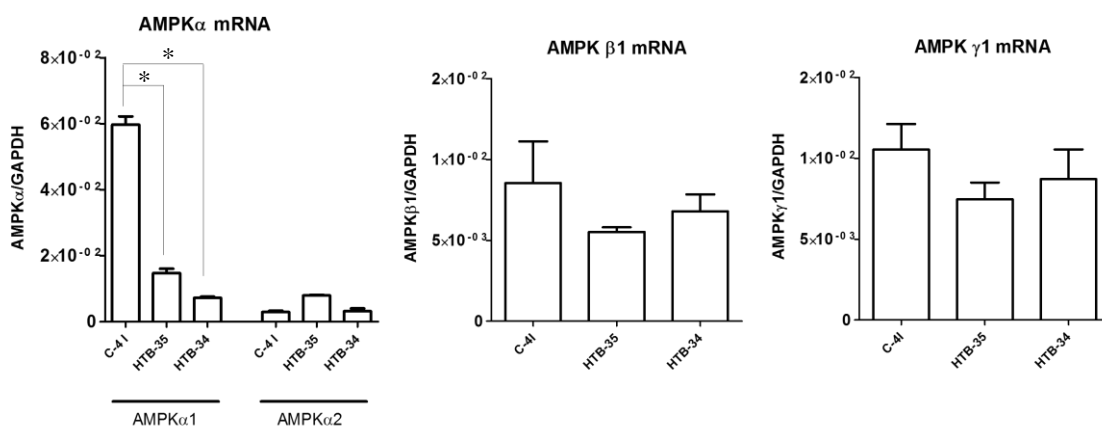


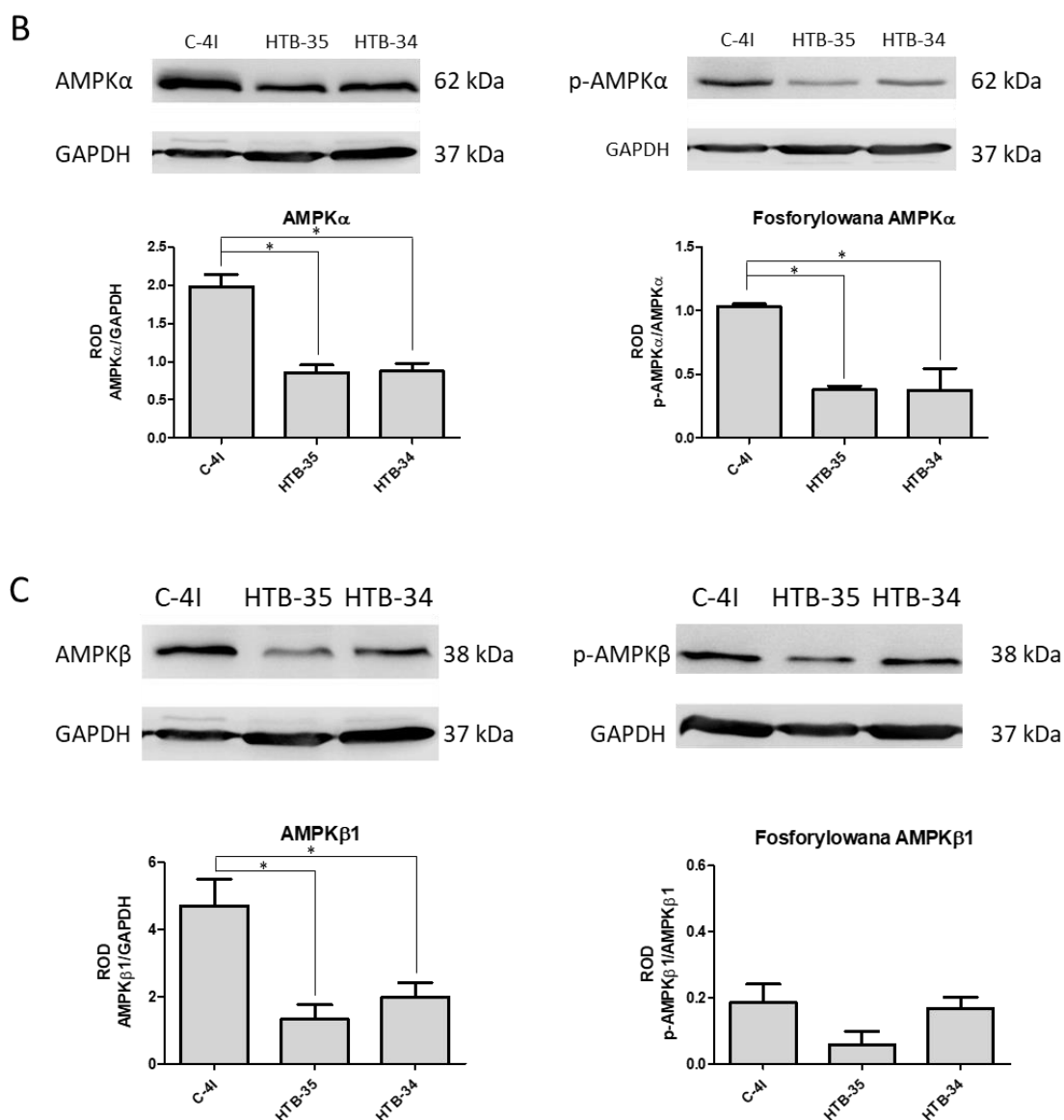
Rycina 5-1. Charakterystyczne cechy linii komórkowych RSM, które stanowią przyjęty model badawczy. Panel A – wizualna ocena morfologii komórek RSM w normalnych warunkach wzrostu. Powiększenie 200x. Panel B – analiza ekspresji głównych markerów fenotypu epithelialnego i mezenchymalnego. Oznaczenie poziomu transkryptu dla Kadheryny E i Wimentyny metodą PCR w czasie rzeczywistym, wykresy reprezentują uśrednione dane z dwóch niezależnych oznaczeń względnej ekspresji oznaczanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH  $\pm$  SD, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ). Panel C – zdolność komórek RSM do ruchu oceniono w teście chemotaksji do FBS. Powiększenie 200x.

## 5.1.2. Ekspresja kinazy AMPK w komórkach RSM

Wybrane linie komórkowe sprawdzono pod względem ekspresji kinazy AMPK oraz jej aktywności. Oceny dokonano na poziomie transkryptu poszczególnych podjednostek składających się na kompleks AMPK, a także przeanalizowano ilość białka AMPK występującą w poszczególnych liniach komórkowych. Oceniono także jej stopień aktywacji poprzez oznaczenie fosforylowanych form podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  tej kinazy. Wykazano, że najwyższą ekspresję transkryptu podjednostki katalitycznej  $\alpha 1$  wykazuje linia C-4I, odpowiadająca wcześniejszemu stadium nowotworu niż linia inwazyjna HTB-35 oraz HTB-34 pochodząca z przerzutu (*Rycina 5-2A*). Jednocześnie badane linie charakteryzują niską ekspresją transkryptu podjednostki  $\alpha 2$ . Oznaczenie ilości mRNA dla podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$  nie wykazało istotnych różnic pomiędzy liniami modelu. Najwyższa ekspresja AMPK $\alpha$  w linii C-4I została potwierdzona również na poziomie białka metodą Western Blot (*Rycina 5-2B*). Należy nadmienić, że wykorzystane przeciwciała rozpoznaje obydwie izoformy podjednostki  $\alpha$ . Użycie przeciwciała przeciwko fosforylowanej formie podjednostki  $\alpha$  (wykrywające obydwie jej izoformy, podobnie jak przeciwciała do całkowitej AMPK $\alpha$ ), pozwoliło pokazać, że również aktywność tej kinazy jest najwyższa w komórkach C-4I. Natomiast badania nie wykazały różnic w ekspresji i aktywności AMPK $\alpha$  pomiędzy liniami HTB-35 i HTB-34. Analogiczne wyniki uzyskano dla ekspresji podjednostki  $\beta 1$ , jakkolwiek jej aktywność nie różni się w obrębie badanych linii (*Rycina 5-2C*).

A





Rycina 5-2. Analiza ekspresji kinazy AMPK i jej aktywności w liniach komórkowych modelu badawczego. Panel A – analiza ekspresji genów *PRKAA1*, *PRKAA2*, *PRKAB1* i *PRKAG1* na poziomie mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykresy reprezentują uśrednione dane z dwóch niezależnych oznaczeń względnej ekspresji oznaczanego genu w stosunku do genu referencyjnego *GAPDH*  $\pm$  SD, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

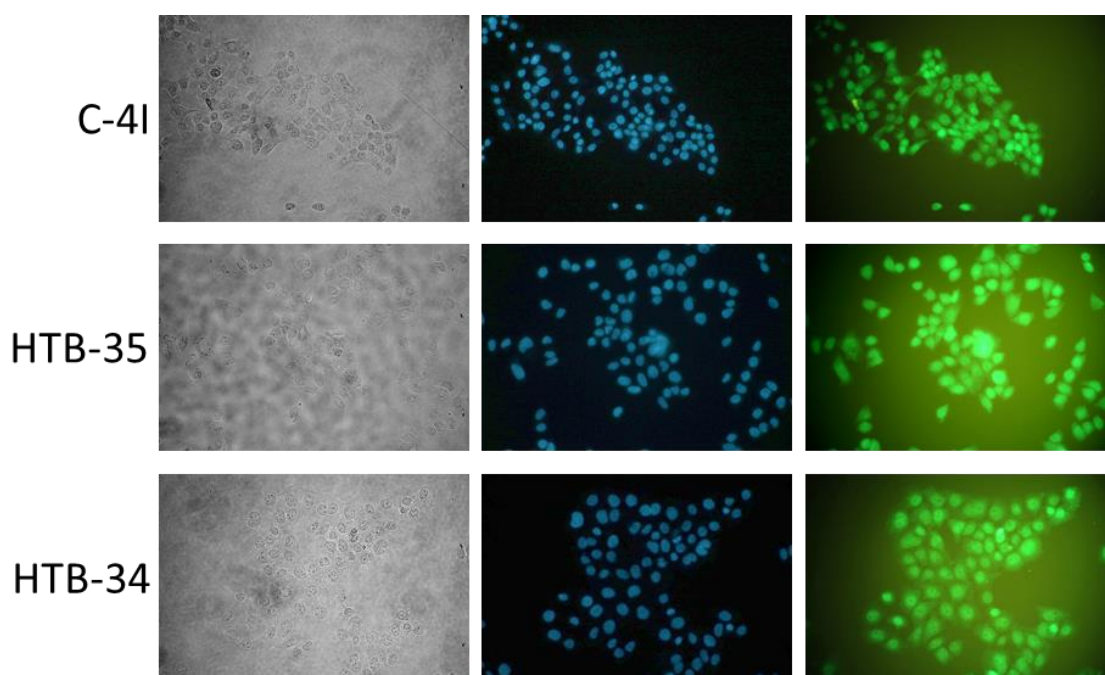
Wynik oznaczenia poziomu ekspresji i aktywacji AMPK $\alpha$  (Panel B) oraz AMPK $\beta$  (Panel C) przy wykorzystaniu techniki Western Blot. Zdjęcia membran przedstawiają reprezentatywne wyniki dla dwóch niezależnych oznaczeń. Wyniki ilościowe



przedstawione na wykresach słupkowych oparto o densytometrię prążków analizowanego genu względem genu referencyjnego GAPDH, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

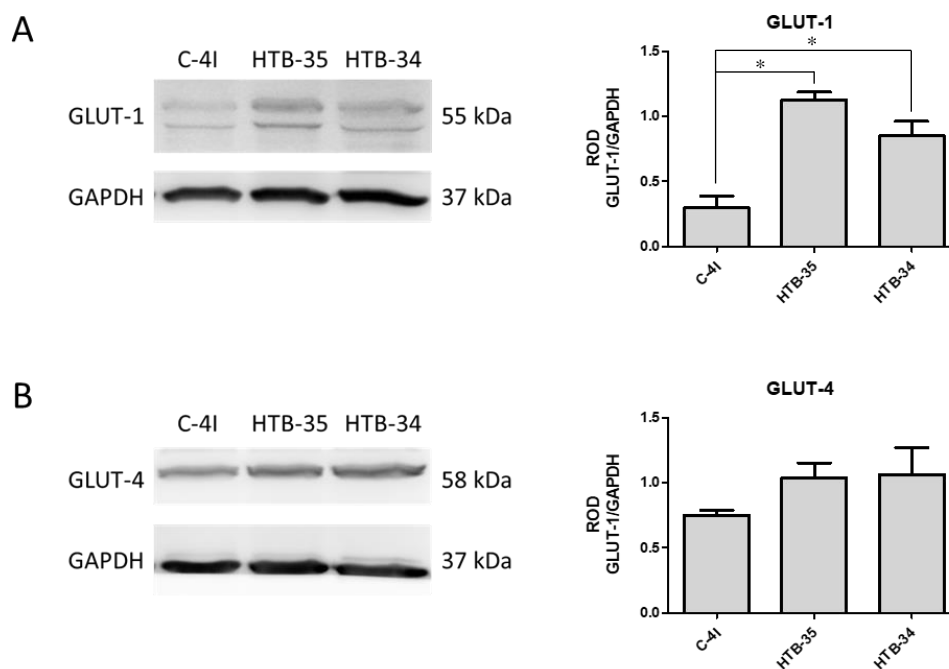
### 5.1.3. Ekspresja transporterów glukozy GLUT-1 i GLUT-4 w komórkach RSM

W komórkach modelu badawczego analizowano ekspresję dwóch transporterów glukozy GLUT-1 i GLUT-4, ponieważ ich wysoka ekspresja występuje w wielu typach nowotworów, a zmiana lokalizacji ich występowania jest bezpośrednio związana z kinazą AMPK. Analizę lokalizacji transportera glukozy GLUT-1 oparto o barwienie immunofluorescencyjne (Rycina 5-3). Uzyskane zdjęcia pozwalają doszukiwać się wyższej ekspresji GLUT-1 w linii HTB-35 – wyższa jasność zielonej fluorescencji.



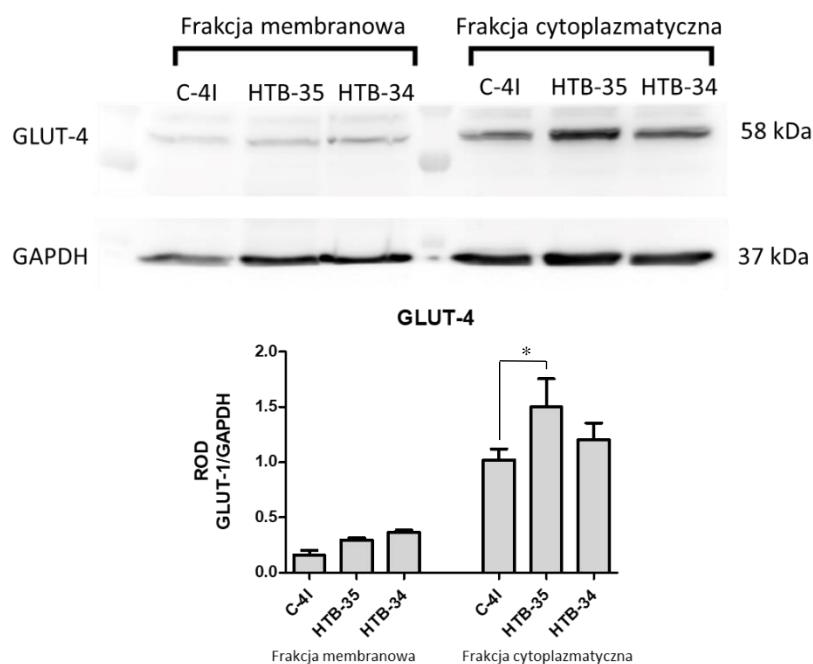
Rycina 5-3. Wynik barwienia immunofluorescencyjnego transportera glukozy GLUT-1. Dla każdej linii komórkowej wykonano oprócz właściwego barwienia GLUT-4 (prawa kolumna) wybarwiono także jądra komórkowe (środkowa kolumna) oraz przedstawiono komórki w jasnym polu widzenia (lewa kolumna). Zdjęcia wykonano przy tych samych ustawieniach czasu naświetlania, przesłony i czułości matrycy. Powiększenie 200x.

Ponieważ barwienie immunofluorescencyjne nie dostarcza danych ilościowych, wykonano oznaczenie ekspresji białka GLUT-1 i GLUT-4 metodą Western Blot (Odpowiednio *Rycina 5-4A* i *5-4B*). Wyniki tego oznaczenia wykazały niższą ekspresję GLUT-1 w komórkach C-4I, a najwyższą w linii komórkowej HTB-35.



*Rycina 5-4. Analiza ekspresji transporterów glukozy GLUT-1 (Panel A) i GLUT-4 (Panel B) metodą Western Blot. Zdjęcia membran przedstawiają reprezentatywne wyniki dla dwóch niezależnych oznaczeń. Analiza ilościowa w oparciu o densytometrię prążków analizowanego genu względem genu referencyjnego GAPDH, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ )*

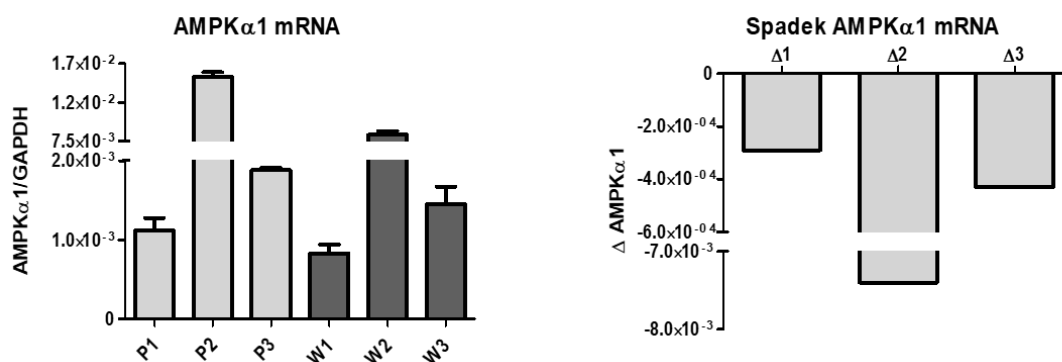
Obserwowalny jest istotnie niższy poziom transportera glukozy GLUT-1 w komórkach C-4I, w stosunku do pozostałych dwóch linii komórkowych, natomiast brak jest takiej różnicy dla białka GLUT-4. Pomimo braku różnic w ekspresji GLUT-4 uzyskanego z całościowych lizatów komórkowych, postanowiono dodatkowo sprawdzić, czy nie będą one występować pomiędzy frakcją cytoplazmatyczną a błonami komórkowymi. Dlatego wykonano oznaczeni ekspresji GLUT-4 osobno dla każdej z tych frakcji (*Rycina 5-5*). Analiza densytometryczna pokazała, istotnie wyższą ekspresję GLUT-4 w cytoplazmie komórek HTB-35 względem komórek C-4I, oraz że ilość transportera glukozy GLUT-4 we frakcji membranowej jest wielokrotnie niższa niż we frakcji cytoplazmatycznej dla wszystkich linii modelu badawczego.



Rycina 5-5. Oznaczenie ekspresji białka GLUT-4 w błonach cytoplazmatycznych i cytoplazmie komórek RSM wykonane metodą Western Blot. Zdjęcia membran przedstawiają reprezentatywne wyniki dla dwóch niezależnych oznaczeń. Analiza ilościowa w oparciu o densytometrię prążków analizowanego genu względem genu referencyjnego GAPDH, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ )

#### 5.1.4. Ekspresja podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1 w materiale klinicznym

Analiza ekspresji kinazy AMPK w liniach komórkowych modelu badawczego pokazuje obniżanie się jej ilości w liniach odpowiadających wyższemu zaawansowaniu nowotworu – HTB-35 i HTB-34. Dlatego wykonano oznaczenie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 w materiale klinicznym, który stanowiły próbki guza pierwotnego i wtórnego pochodzącego z przerzutu do węzła chłonnego. Istotne jest, iż do oznaczeń użyto trzech par próbek guz pierwotny – przerzut, gdzie każda taka para pochodzi od jednej pacjentki. Wyniki analizy ekspresji AMPK $\alpha$ 1 na poziomie mRNA pokazuje Rycina 5-6. Dla każdej analizowanej pary próbek wykazano niższą ekspresję AMPK $\alpha$ 1 w przerzucie względem guza pierwotnego.



Rycina 5-6. Porównanie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 w guzie pierwotnym (P1, P2, P3) i przerzucie do węzła chłonnego (W1, W2, W3) w grupie trzech pacjentek. Wykres po lewej reprezentuje względną ekspresję oznaczanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH  $\pm$  SD. Wykres po prawej stronie pokazuje obliczony spadek ekspresji AMPK $\alpha$ 1 w przerzucie względem guza pierwotnego.

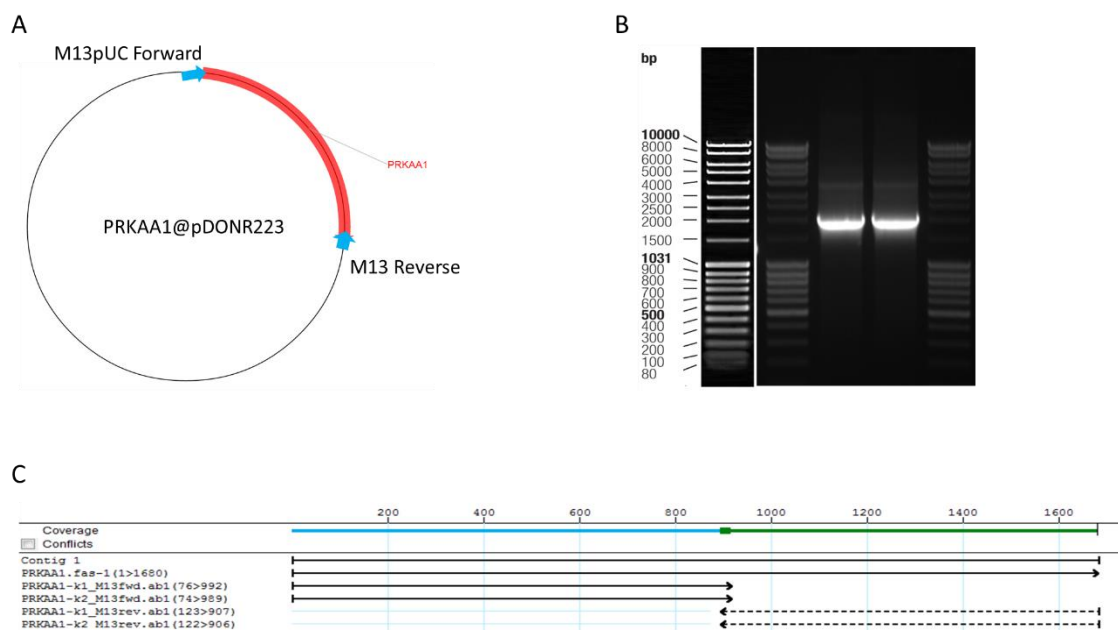
## 5.2. Uzyskanie linii komórkowej o podwyższonej ekspresji AMPK $\alpha$

Założenia projektu doktorskiego obejmowały przygotowanie cząstek lentiwirusowych wprowadzających do genomu komórek docelowych gen podjednostki katalitycznej  $\alpha$ 1 kinazy AMPK (PRKAA1) połączonego z genem reporterowym białka zielonej fluorescencji GFP przy pomocy sekwencji P2A. Zgodnie z wyznaczonymi celami projektu, linią komórkową poddawaną modyfikacji genetycznej, która doprowadzi do zwiększenia ekspresji kinazy AMPK, była linia komórkowa HTB-35, charakteryzująca się niską endogenną ekspresją tej kinazy. Z uzyskanych uprzednio wyników dotyczących charakterystyki ekspresji poszczególnych podjednostek kinazy AMPK w komórkach przyjętego modelu RSM wynika, iż podjednostką zdecydowanie różnicującą linie o różnym stopniu złośliwości jest  $\alpha$ 1. Z tego powodu przedstawiane dalej wyniki dotyczące genetycznych modyfikacji linii C-4I i HTB-35 dotyczą modyfikacji ekspresji podjednostki katalitycznej  $\alpha$ 1 kinazy AMPK.

### 5.2.1. Weryfikacja sekwencji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1

W celu uzyskania linii komórkowej o podwyższonej ekspresji AMPK $\alpha$ , wykorzystano pozyskany z repozytorium Addgene plazmid PRKAA1@pDONR223 zawierający tę sekwencję (schemat plazmidu na Rycinie 5-7A). Pierwszym krokiem było

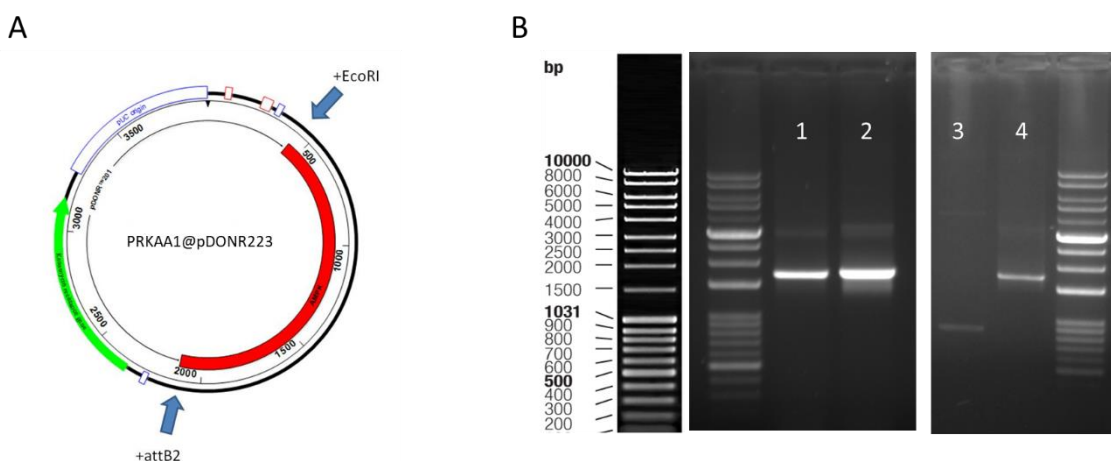
sprawdzenie poprawności sekwencji AMPK $\alpha$ 1. Po wyizolowaniu plazmidu z hodowli bakteryjnej, amplifikowano sekwencję PRKAA1 i rozdzielono na 1% żelu agarozowym. Otrzymano produkt o właściwej długości (*Rycina 5-7B*). Następnie dwa klony plazmidu sekwencjonowano metodą Sanger, co pozwoliło potwierdzić, że sekwencja jest prezentowana w bazie danych NCBI jako ludzka kinaza aktywowany przez AMP - podjednostka katalityczna  $\alpha$ 1 (PRKAA1). Jest to pełna sekwencja kodująca dla tej podjednostki (CDS). Stwierdzono, że w analizowanych sekwencjach nie ma mutacji względem sekwencji referencyjnej.



*Rycina 5-7. Weryfikacja sekwencji genu PRKAA1 w posiadanym plazmidzie poprzez sekwencjonowanie metodą Sanger. Panel A – schematyczne przedstawienie plazmidu PRKAA1@Pdonr223 z zaznaczonymi miejscami kotwiczenia starterów M13. Panel B – wynik amplifikacji sekwencji PRKAA1 z plazmidowego DNA przy wykorzystaniu starterów M13. Panel C – widok pokrycia sekwencji PRKAA1 uzyskany po sekwencjonowaniu metodą Sanger, która nie wykazała żadnych mutacji w analizowanych sekwencjach względem sekwencji referencyjnej PRKAA1 dostępnej w bazie NCBI.*

## 5.2.2. Wprowadzenie sekwencji flankujących sekwencję PRKAA1

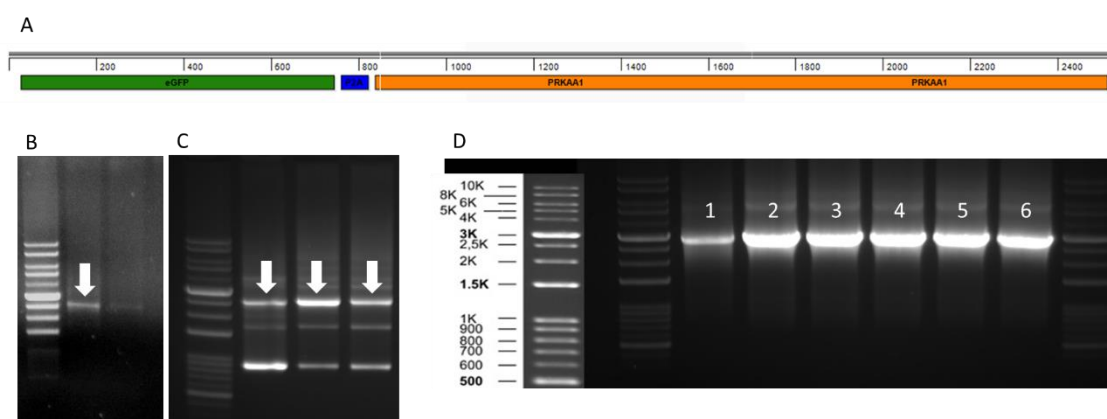
W celu stworzenia konstruktów genowych GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1, na matrycy plazmidu PRKAA1@pDONR223 amplifikowano sekwencję AMPK $\alpha$ 1 używając starterów wprowadzających sekwencje flankujące (*Rycina 5-8A*). Po sprawdzeniu czy uzyskany amplikon posiada właściwą długość trawiono wprowadzone miejsce restrykcyjne restryktazą EcoRI (*Rycina 5-8B*). Drugim komponentem konstruktów jest fragment GFP-P2A, który był dostępny wcześniej w miejscu realizacji projektu doktorskiego. Fragment ten posiadał już wprowadzone miejsca attB (od końca 5') i miejsce restrykcyjne EcoRI (3'), dlatego wymagał jedynie trawienia restrykcyjnego (*Rycina 5-8B*).

*Rycina 5-8. Przygotowanie sekwencji PRKAA1 do ligacji z sekwencją GFP-P2A*

*Panel A – schemat wprowadzenia sekwencji flankujących do PRKAA1. Od końca 5' zaznaczono sekwencję zawierającą miejsce restrykcyjne EcoRI, a od końca 3' sekwencję attB2 wymaganą w klonowaniu molekularnym metodą "GATEWAY". Panel B – wynik rozdziału elektroforetycznego mieszaniny po reakcji PCR (ścieżki na żelu oznaczone 1 i 2). Widoczne amplikony w ścieżkach 1 i 2 różnią się intensywnością, ponieważ zastosowano inne temperatury przyłączenia starterów do matrycy (optymalizacja reakcji PCR). Prążek widoczny w ścieżce 4 to sekwencja genu oflankowana sekwencją genu AMPK $\alpha$ 1 przygotowana to ligacji z konstruktem GFP-P2A, który miejsce restrykcyjne ma wprowadzone od końca 3' (produkt widoczny w ścieżce nr 3).*

5.2.3. Uzyskanie konstruktów genowych GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1

Konstrukt genowy GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 uzyskano poprzez ligację dwóch fragmentów DNA kodujących GFP-P2A i AMPK $\alpha$ 1. Wcześniejsza obróbka restrykcyjna polegała na trawieniu enzymem EcoRI, co pozwoliło wygenerować tzw. lepkie końce na obydwu fragmentach. W przypadku sekwencji GFP-P2A miejsce restrykcyjne znajduje się na końcu 3', a w sekwencji AMPK $\alpha$ 1 na końcu 5', dzięki czemu, po ligacji powstaje liniowy konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 (*Rycina 5-9A*). Wprowadzone wcześniej sekwencje flankujące attB (na końcu 5' GFP i końcu 3' AMPK $\alpha$ 1) pozwalają rekombinować konstrukt do plazmidu pENTR, który następnie zostaje namnożony w bakteriach (technologia „GATEWAY”). Uzyskane w ten sposób DNA, po weryfikacji poprawności sekwencji, służy do dalszych manipulacji, w tym, przede wszystkim, do uzyskania plazmidów ekspresyjnych. Na *Rycinie 5-9D* widoczny jest rezultat amplifikacji sekwencji GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 na matrycy wyizolowanego DNA plazmidowego z 6 klonów bakteryjnych.

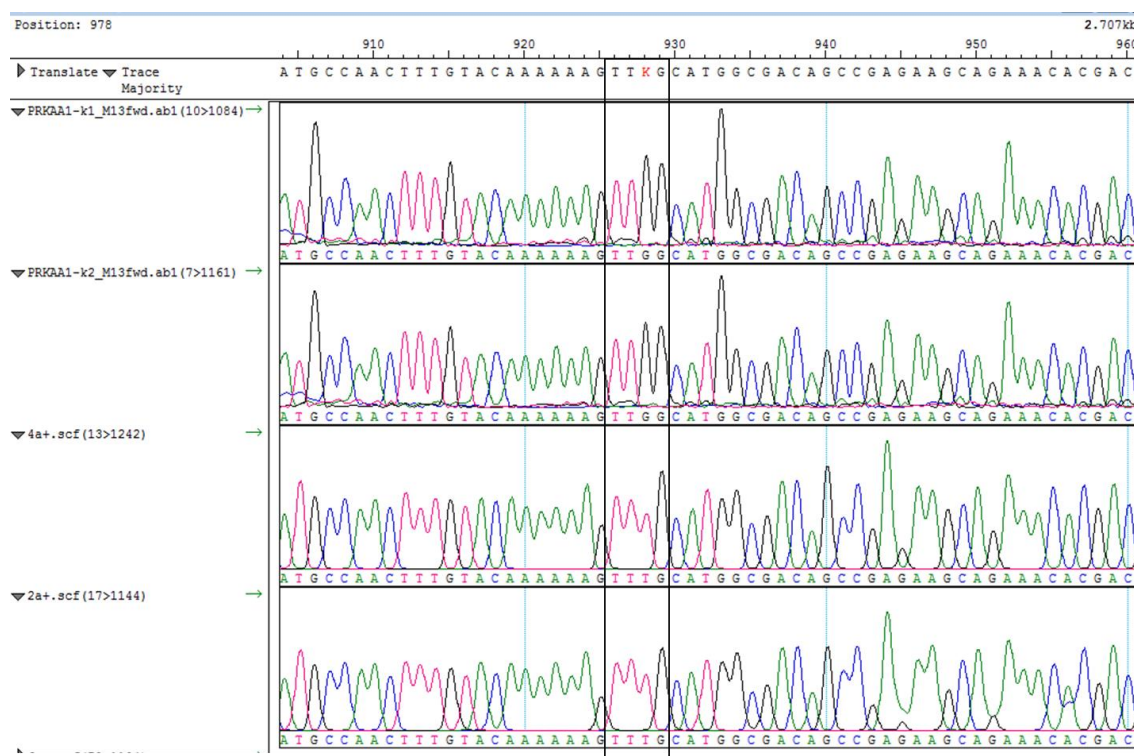


*Rycina 5-9. Wynik klonowania przygotowanego konstruktów GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1. Panel A – mapa konstruktów genowych pokazująca układ sekwencji genu reporterowego białka zielonej fluorescencji GFP i podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1 połączonych „linkerem” P2A. Panel B – produkt otrzymany po ligacji sekwencji GFP-P2A z sekwencją AMPK $\alpha$ 1. Panel C – optymalizacja amplifikacji otrzymanego konstruktów GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1, strzałki pokazują amplikony o właściwej długości. Prążki widoczne poniżej są niezligowanymi fragmentami użytymi do reakcji ligacji. Panel D – wynik amplifikacji konstruktów GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 z uzyskanych plazmidów pENTR z 6 klonów bakteryjnych.*



5.2.4. Weryfikacja poprawności sekwencji uzyskanego konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1

Otrzymane w poprzednim etapie plazmidy pENTR zawierające wstawkę w postaci konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 zostały sekwencjonowane metodą Sangera w celu sprawdzenia poprawnej sekwencji nukleotydowej tego konstrukt. Niestety, wynik sekwencjonowania pokazał występowanie mutacji w obrębie sekwencji AMPK $\alpha$ 1 we wszystkich wyizolowanych plazmidach pENTR. Powtarzająca się substytucja nukleotydowa G do T w pozycji 928 powoduje zmianę aminokwasu i wyklucza dalsze wykorzystanie takiego konstrukt. Obecność substytucji we wszystkich sześciu sekwencjonowanych plazmidach sugeruje, że powstała ona we początkowych cyklach reakcji PCR amplifikacji ligatu GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1. Jest to o tyle zaskakujące, że na wszystkich etapach przygotowania konstrukt genowego używano polimerazy typu High-Fidelity obciążonej bardzo niskim współczynnikiem błędnego wbudowania nukleotydu.

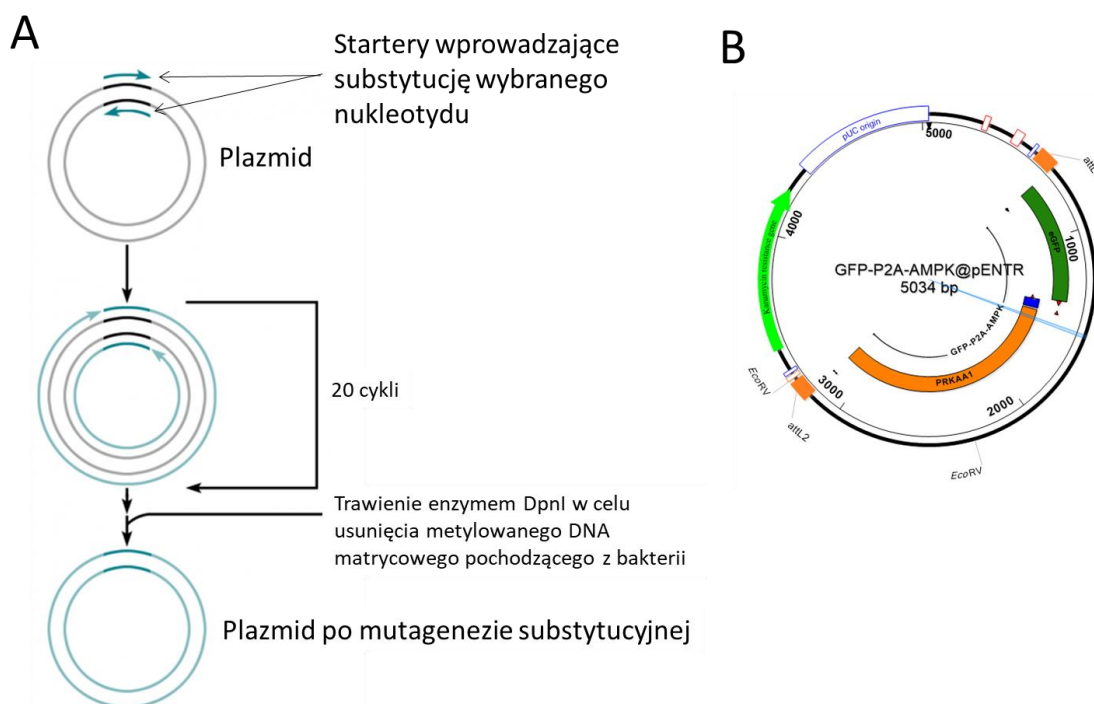


Rycina 5-10. Wynik sekwencjonowania plazmidów zawierających konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1. Dwa górne chromatogramy – wyniki sekwencjonowania wyjściowych plazmidów stanowiących źródło sekwencji AMPK $\alpha$ 1. Dwa dolne chromatogramy – wyniki sekwencjonowania plazmidów pENTR z wklonowanym konstruktem genowym GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1. Widoczna substytucja G do T (nukleotydy zaznaczone ramką).



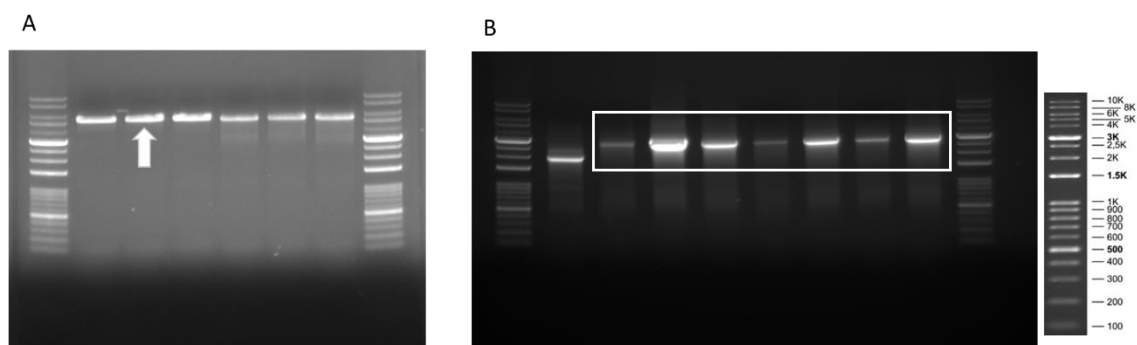
## 5.2.5. Mutageneza miejscowo specyficzna

Strategią postępowania, w przypadku substytucji nukleotydu w konstrukcie GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 uniemożliwiającej wykorzystanie konstruktu genowego, powinno być zasadniczo powtórzenie procedury tworzenia tego konstrukt od nowa. Nie zdecydowano się jednak na ten krok, z uwagi na fakt, iż wydajność ligacji GFP-P2A z sekwencją AMPK $\alpha$ 1 była niska, co utrudniało specyficzną i wystarczająco wydajną amplifikację ligatu. Zamiast tego, postanowiono zastosować podejście celowej mutagenezy miejscowo specyficznej, która pozwala na substytucję, delecję lub insercję wybranego nukleotydu w kolistej cząsteczce DNA.



Rycina 5-11. Schemat mutagenezy miejscowo specyficznej. Panel A - idea mutagenezy miejscowo specyficznej w aplikacji mutagenezy substytucyjnej. Panel B - zaznaczone miejsca z substytucją nukleotydową na mapie plazmidu GFP-P2A-AMPK@pENTR

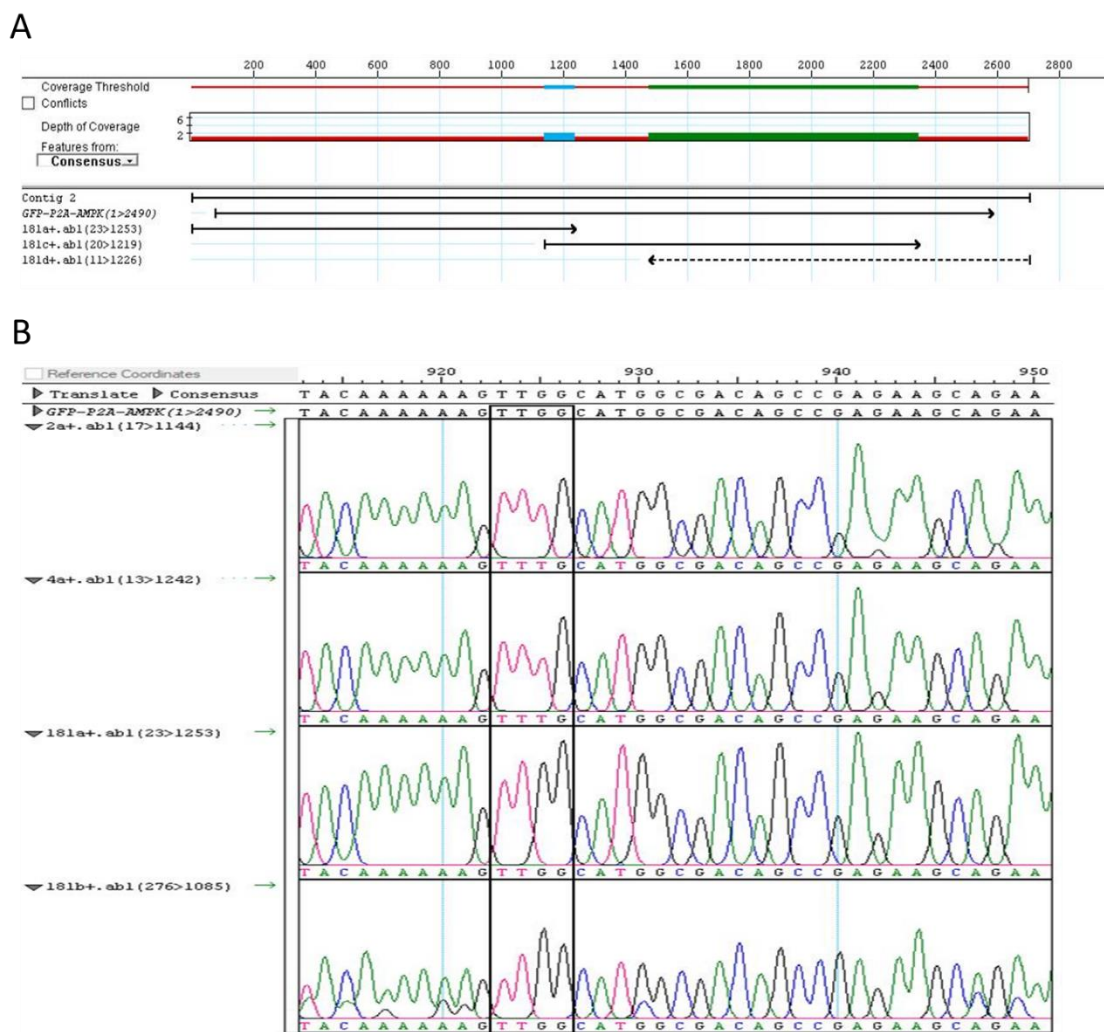
Po przeprowadzeniu procedury mutagenazy miejscowo specyficznej, powstałe plazmidy hybrydowe rozdzielono na żelu w celu weryfikacji ich długości. Z sześciu hybrydowych plazmidów, trzy okazały się pozytywne (*Rycina 5-12A*). Jeden wybrany posłużył do transformacji bakterii kompetentnych, z których następnie wyizolowano osiem klonów plazmidów (*Rycina 5-12B*).



*Rycina 5-12. Zastosowanie metody mutagenazy miejscowo specyficznej do substytucji nieprawidłowego nukleotydu w sekwencji GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1. Panel A - plazmidy hybrydowe uzyskane po mutagenazie substytucyjnej. Pierwsze trzy prążki od lewej pokazują pozytywne klony, w trzech pozostałych widoczny są niespecyficzne produkty poniżej produktu o właściwej długości. Strzałką zaznaczono plazmid, którym transformowano bakterie kompetentne. Panel B- pozytywne klony (zaznaczone ramką) co do długości konstruktu GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 uzyskane po transformacji bakterii kompetentnych. Do weryfikacji poprawności sekwencji wybrano 4 o najwyższym stężeniu.*

#### 5.2.6. Weryfikacja poprawności sekwencji konstruktu genowego GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 po mutagenazie miejscowo specyficznej

Analiza sekwencji plazmidów GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1@pENTR po przeprowadzonej mutagenazie miejscowo specyficznej wykazała, że zastosowane podejście pozwoliło usunąć wcześniejszą substytucję G $\rightarrow$ T (*Rycina 5-13B*). Nie wykazano żadnych innych mutacji w konstrukcie GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1, sekwencje obydwu kodowanych białek w 100% odpowiadały sekwencjom referencyjnym.

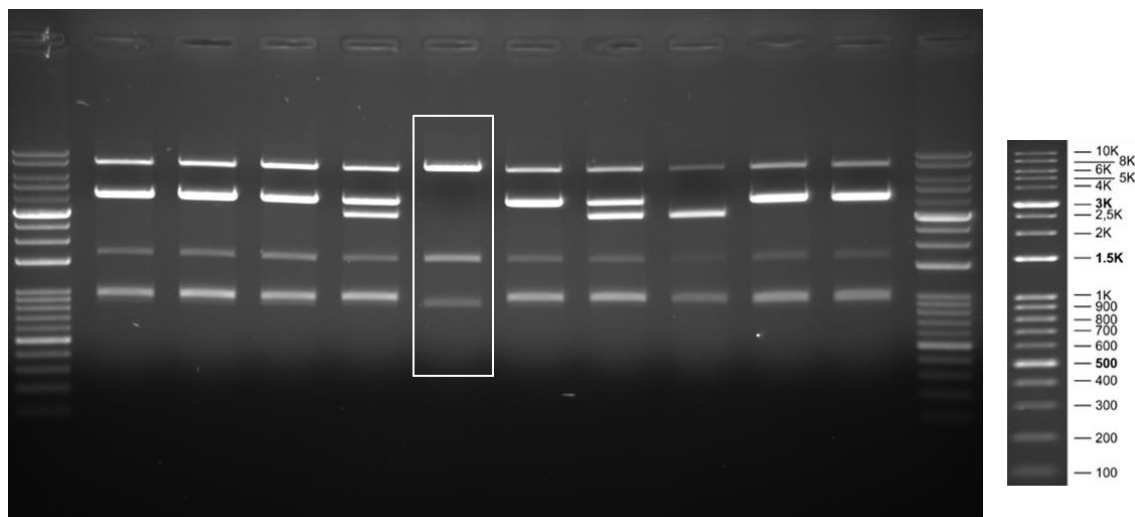


Rycina 5-13. Wynik sekwencjonowania plazmidu *GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1@pENTR* po zastosowaniu mutagenazy miejscowo specyficznej. Panel A – schemat sekwencjonowania konstrukt *GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1* pozwalający pokryć całość sekwencji nukleotydowej. Panel B - klon *GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1@pENTR* po mutagenzie substytucyjnej z przywróconym nukleotydem G (dwa dolne chromatogramy) w porównaniu do plazmidu wyjściowego (dwa górne chromatogramy).

### 5.2.7. Uzyskanie plazmidu ekspresyjnego zawierającego konstrukt *GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1*

Przywrócenie prawidłowej sekwencji nukleotydowej konstrukt *GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1* umożliwiło kontynuację działań prowadzących do uzyskania plazmidu ekspresyjnego niezbędnego do produkcji lentiwirusa modyfikującego docelowe komórki HTB-35. Rekombinacja plazmidu *pENTR* z plazmidem *pLenti6/UbC* (technologia

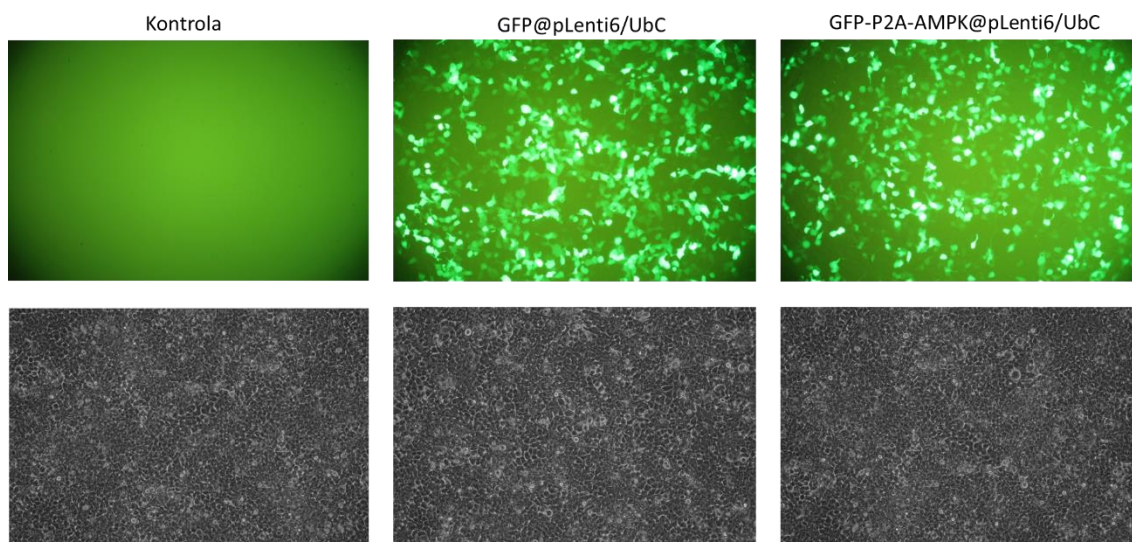
„GATEWAY”) pomimo niskiej wydajności, pozwoliła na otrzymanie prawidłowego plazmidu ekspresyjnego GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1@pLenti6/UbC, co zostało potwierdzone trawieniem restrykcyjnym (*Rycina 5-14*).



*Rycina 5-14. Wynik trawienia restrykcyjnego po rekombinacji plazmidu pENTR do ekspresyjnego pLentiPozytywny. Pozytywny klon plazmidu GFP-P2A-AMPK@pLenti6/UbC oznaczono ramką.*

#### 5.2.8. Weryfikacja funkcjonalna uzyskanego plazmidu zawierającego konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1

Po uzyskaniu pozytywnego klonu ekspresyjnego zawierające konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1, sprawdzono jego funkcjonalność poprzez transfekcję testowej linii komórkowej HEK293T. Obecność genu reporterowego w postaci GFP, umożliwiło wizualną weryfikację prawidłowej ekspresji wprowadzonego transgenu (*Rycina 5-15*). Posiadany wcześniej plazmid GFP@pLenti6/UbC był użyty jako pozytywna kontrola transfekcji i ekspresji GFP. Ocena fluorescencji w porównaniu do komórek nietransfekowanych wykazała, że opracowany konstrukt GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1 ulega prawidłowej ekspresji a intensywność fluorescencji jest na porównywalnym poziomie co w przypadku plazmidu kontrolnego z samym genem reporterowym GFP.



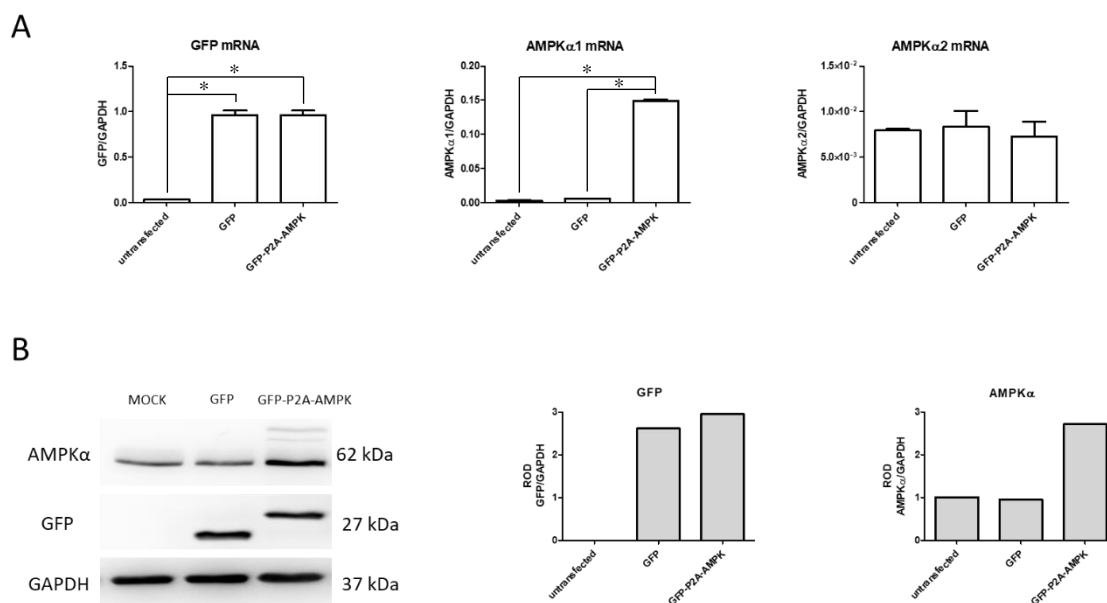
Rycina 5-15. Transfekcja linii komórkowej HEK293T plazmidami ekspresyjnymi GFP@pLenti6/UbC oraz GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1@pLenti6/UbC. Kontrolą negatywną są komórki do których dodano jedynie czynnik transfekcyjny bez DNA plazmidowego.

W celu dokładniejszej weryfikacji funkcjonalności plazmidu, po opisanej transfekcji, zebrano transfekowane komórki HEK293T w celu izolacji RNA oraz całościowej puli białka. Uzyskany materiał posłużył do sprawdzenia ekspresji wprowadzonych transgenów na poziomie transkryptu jak i na poziomie białka.

Metodą PCR w czasie rzeczywistym oceniono, że poziom mRNA dla GFP był porównywalny dla obydwu plazmidów (Rycina 5-16A). Wykazano również wzrost transkryptu podjednostki katalitycznej  $\alpha$ 1 kinazy AMPK w komórkach transfekowanych plazmidem z opracowanym konstruktem, natomiast, zgodnie z oczekiwaniami, nie zaobserwowano zmian ilości mRNA podjednostki katalitycznej  $\alpha$ 2. Warto nadmienić, że sama transfekcja nie przyczynia się również do modyfikacji ilości transkryptu żadnej z izoform podjednostki  $\alpha$  kinazy AMPK.

Uzyskane wyniki analizy poziomu białek GFP i AMPK $\alpha$  metodą Western Blot odpowiadają wynikom uzyskanym dla transkryptów tych białek. Interesującym faktem jest przesunięcie wysokości prążka odpowiadającego GFP w komórkach transfekowanych konstruktem GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1, co spowodowane jest występującym kilkuaminokwasowym nawisem powstałym po rozpadzie linkera P2A (Rycina 5-16B).

Świadczy to o prawidłowym działaniu linkera P2A pozwalającego na jednoczesną ekspresję dwóch białek w takim samym stosunku stechiometrycznym (1:1).



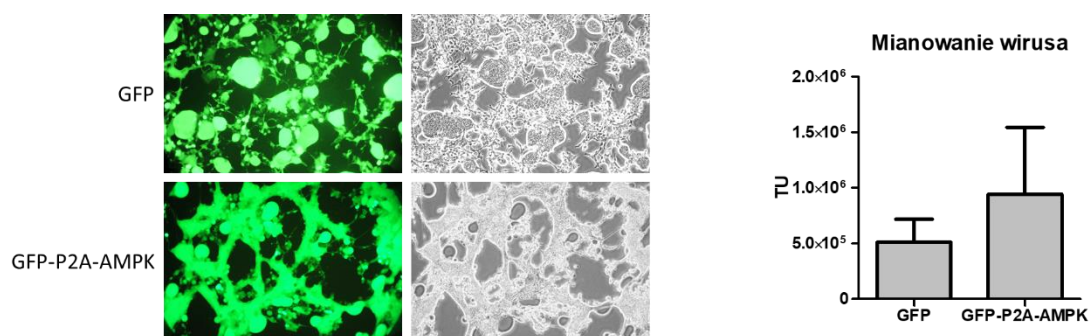
Rycina 5-16. Analiza ekspresji wprowadzonych transgenów GFP i AMPK $\alpha$ 1 w komórkach HEK293T. Panel A – wyniki oznaczenia ekspresji transkryptów GFP, AMPK $\alpha$ 1 i AMPK $\alpha$ 2 uzyskane metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykresy przedstawiają uśrednione dane z dwóch niezależnych eksperymentów  $\pm$ SD, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ). Panel B – oznaczenie ekspresji białek GFP i AMPK $\alpha$  metodą Western Blot. W przypadku transfekcji plazmidem GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1@pLenti6/UbC można zauważyć pewną frakcję białka AMPK $\alpha$ 1 z przyłączonym GFP (delikatnie widoczny prążek powyżej właściwego prążka AMPK $\alpha$ ) co świadczy o niepełnej wydajności rozpadu linkera P2A. Analizę ilościową oparto o densytometrię specyficznych prążków GFP i AMPK $\alpha$  względem genu referencyjnego GAPDH. Oznaczenie wykonano jednokrotnie.

### 5.2.9. Produkcja cząstek lentiwirusowych służących do wprowadzenia trwałej nadekspresji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1

Posiadając palzmidy ekspresyjne GFP@pLenti6/UbC oraz GFP-P2A-AMPK $\alpha$ 1@pLenti6/UbC wyprodukowano cząstki lentiwirusowe w linii pakującej HEK293T (Rycina 5-17). Wirusy mianowano używając infekując linię komórkową HT-

1080. Oznaczone miano było na zadowalającym poziomie, dlatego pominięto etap zagęszczania wirusa i przystąpiono do transdukcji linii HTB-35.

W dalszych wynikach dotyczących linii HTB-35, wyprodukowany wirus wprowadzający nadekspresję podjednostki  $\alpha 1$  kinazy AMPK oznaczany jest jako GFP-P2A-AMPK, a wyprowadzona linia z nadekspresją tego białka oznaczana są jako HTB-35 GFP-P2A-AMPK.

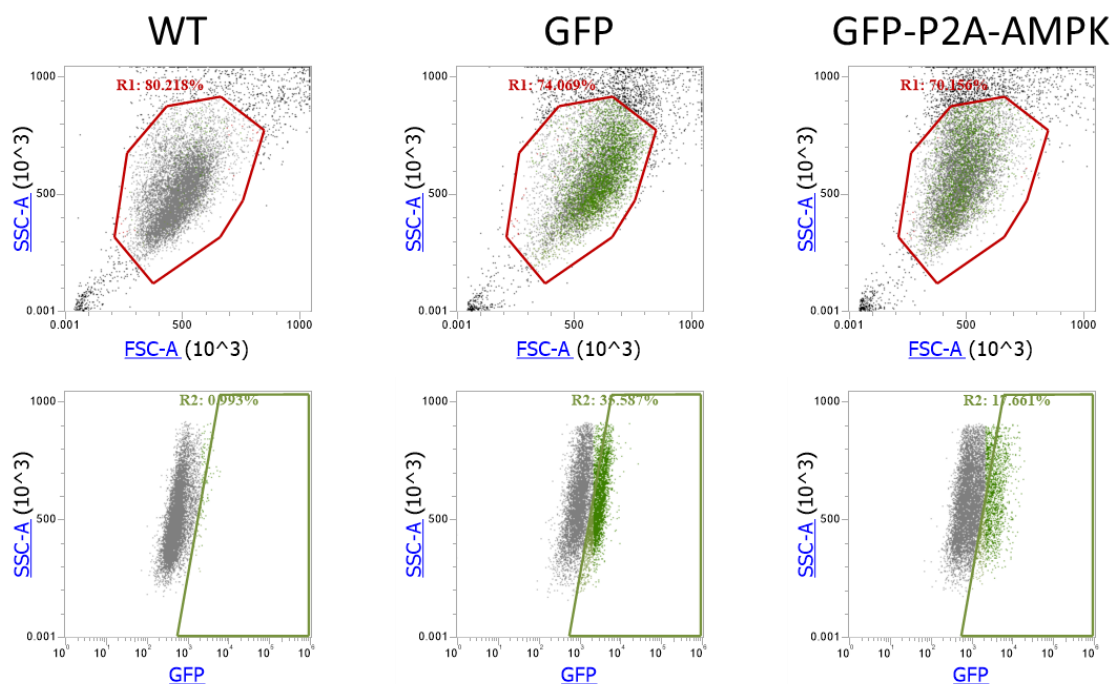


Rycina 5-17. Produkcja lentiwirusów GFP oraz GFP-P2A-AMPK w komórkowej linii pakującej HEK293T. Zdjęcia z mikroskopu pokazują tworzenie syncytiów ze zlewających się komórek, co jest charakterystycznym zjawiskiem przy produkcji wirusa. Po prawej stronie wykres prezentujący uzyskane średnie miano wirusów GFP i GFP-P2A-AMPK.

#### 5.2.10. Transdukcja linii HTB-35 wyprodukowanym lentiwirusem

Przy użyciu wyprodukowanych wirusów GFP i GFP-P2A-AMPK transdukowano komórki linii HTB-35. Po zakończeniu selekcji antybiotykowej uzyskano 2 zmodyfikowane linie komórkowe. Obecność genu reporterowego białka zielonej fluorescencji GFP pozwoliła na cytofluometryczną ocenę wyprowadzonych linii pod względem odsetka komórek wykazujących ekspresję tego markera (Rycina 5-18). Weryfikacja odsetka komórek GFP pozytywnych wykazała stosunkowo niską liczbę tych komórek w populacji komórek odpornych na antybiotyk selekcyjny.





Rycina 5-18. Analiza cytofluometryczna wyselekcjonowanych linii HTB-35: GFP i GFP-P2A-AMPK. Odsetek pozytywnych komórek wykazujących zieloną fluorescencję wyniósł ok 36% dla linii GFP i ok 18% dla linii GFP-P2A-AMPK.

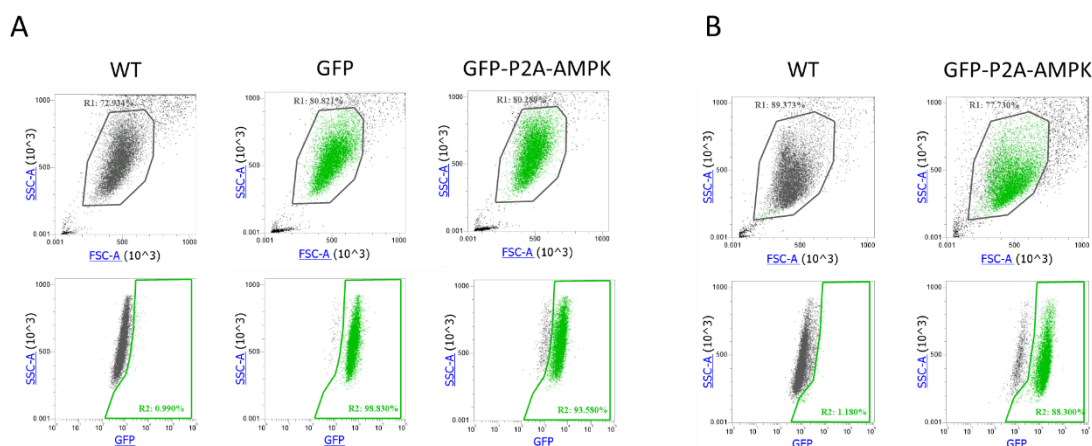
### 5.2.11. Sortowanie modyfikowanych linii komórkowych HTB-35

Obecność genu reporterowego pozwala na zastosowanie cytofluometrycznego sortowania komórek (FACS) w celu wzbogacenia populacji komórek w komórki GFP pozytywne. Jest to o tyle istotne, że w komórkach GFP-P2A-AMPK, z powodu użycia linkera P2A, ekspresja GFP jest wprost proporcjonalna do ekspresji AMPK $\alpha$ 1, zatem sortując komórki GFP pozytywne, otrzymujemy jednocześnie populację z wysoką ekspresją AMPK $\alpha$ 1. Z linii HTB-35 GFP i HTB-35 GFP-P2A-AMPK wysortowano 10% komórek o najwyższej intensywności fluorescencji (MFI). Oznaczenie odsetka komórek GFP pozytywnych wykazało, że wyniósł on około 99% dla linii GFP oraz około 94% dla GFP-P2A-AMPK (Rycina 5-19A).

Po czterech tygodniach hodowli tych linii postanowiono ponownie sprawdzić cytofluometrycznie odsetek komórek GFP pozytywnych. O ile odsetek ten nie zmienił

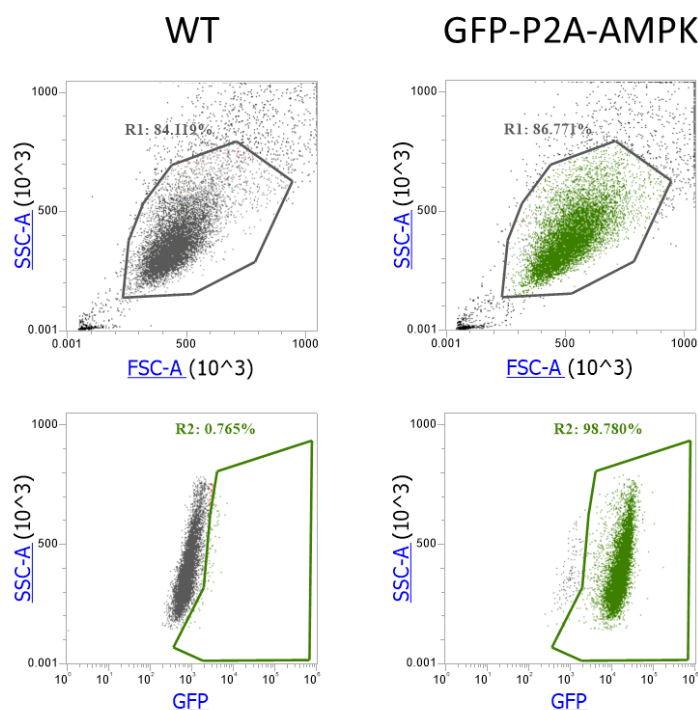


się w linii HTB-35 GFP, to w linii HTB-35 GFP-P2A-AMPK spadł do poziomu około 88% co wynikało z powiększenia się liczby komórek niewykazujących zielonej fluorescencji (a zatem niewykazujących zwiększonej ekspresji AMPK $\alpha$ 1) – Rycina 5-19B.



Rycina 5-19. Analiza cytofluorymetryczna komórek HTB-35 GFP i GFP-P2A-AMPK po przeprowadzonej procedurze sortowania FACS. Panel A – diagramy dla komórek bezpośrednio po ich sortowaniu. Odsetki komórek wykazujących zieloną fluorescencję to około 99% dla HTB-35 GFP i 94% dla GFP-P2A-AMPK. Panel B – linia komórkowa GFP-P2A-AMPK po czterech tygodniach od procedury sortowania FACS. Widoczny wzrost odsetka komórek niewykazujących ekspresji białka zielonej fluorescencji, co spowodowało spadek odsetka komórek GFP pozytywnych do około 88%.

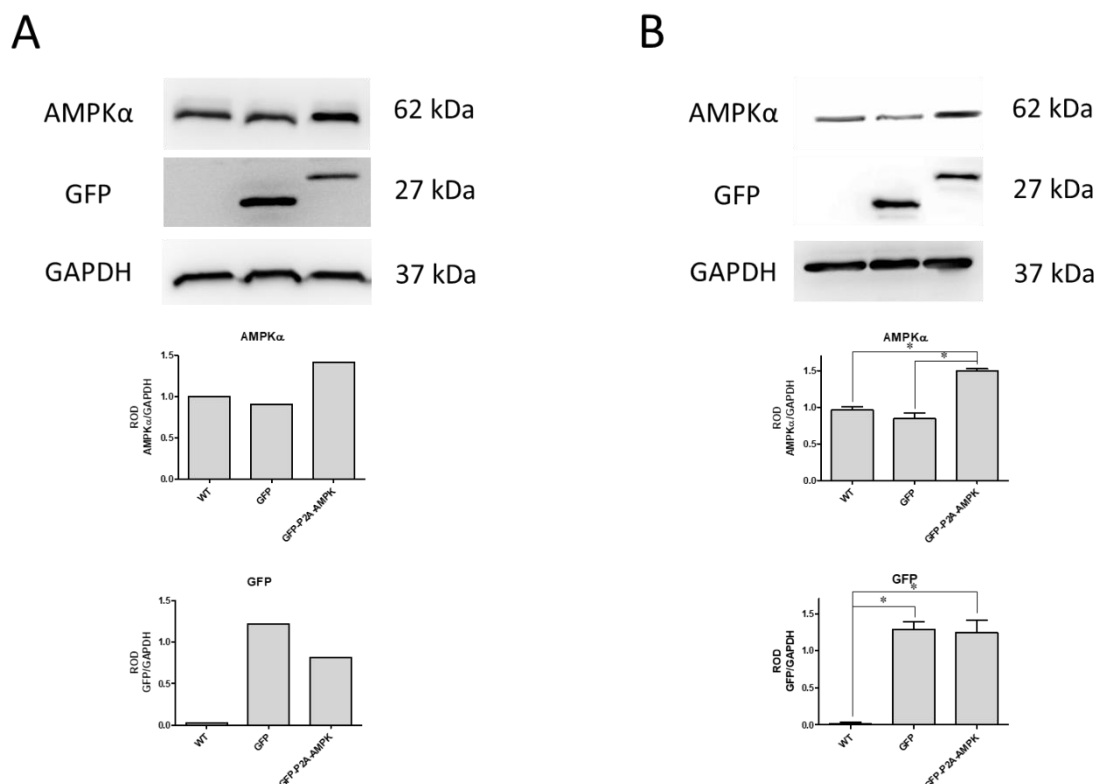
Wobec spadku odsetka komórek GFP pozytywnych w linii HTB-35 GFP-P2A-AMPK zdecydowano powtórnie wykonać procedurę cytofluorymetrycznego sortowania komórek przyjmując identyczne parametry sortowania (10% komórek wykazujących najwyższe MFI). Uzyskano populację o dużej czystości (około 99% komórek GFP pozytywnych) wykazującą przy tym wyższe MFI niż populacja komórek po pierwszej procedurze sortowania (por. Rycina 5-20 i Rycina 5-19B).



Rycina 5-20. Wynik drugiego sortowania FACS komórek HTB-35 GFP-P2A-AMPK. Wysortowana populacja zawiera prawie 99% komórek wykazujących zieloną fluorescencję.

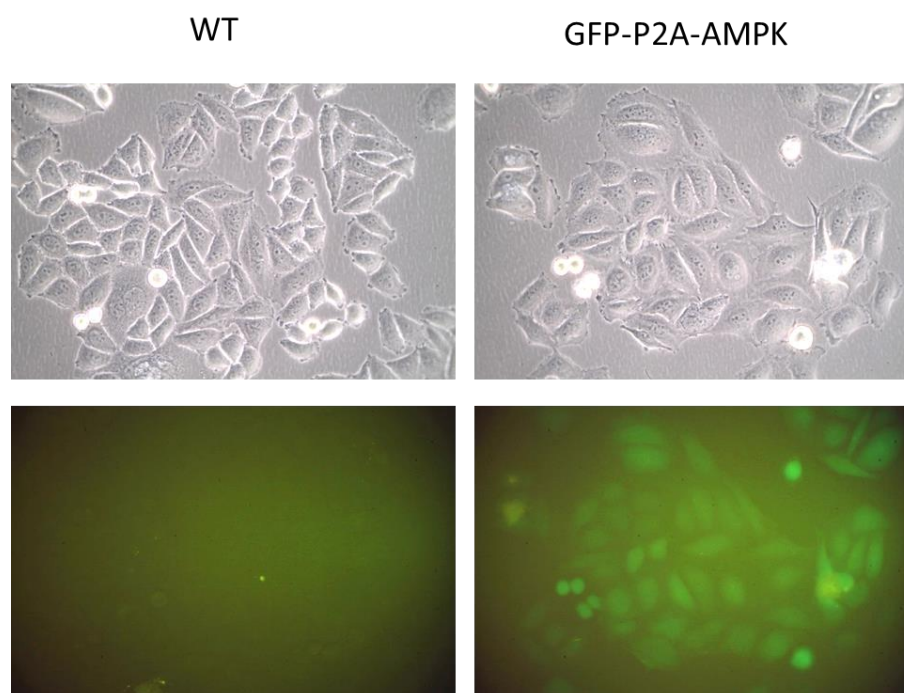
#### 5.2.12. Weryfikacja uzyskania podwyższonej ekspresji podjednostki katalitycznej $\alpha 1$ kinazy AMPK

Po każdym sortowaniu komórek oznaczano poziom ekspresji białek GFP i AMPK $\alpha$  metodą Western Blot. Dane z oznaczeń zebrano na Rycinie 5-21. Uzyskano 50% wzrost ekspresji podjednostki katalitycznej  $\alpha 1$ . Poza tym, komórki po drugiej procedurze sortowania wykazują wyższą ekspresję GFP niż po pierwszym sortowaniu – osiąga identyczny poziom z linią HTB-35 GFP. Oznaczenie po pierwszym sortowaniu komórek wykonano jednokrotnie, natomiast po drugim – dwukrotnie.



Rycina 5-21. Wynik analizy ekspresji białek GFP i AMPK $\alpha$  w wyselekcjonowanych i sortowanych liniach HTB-35. Panel A – Western Blot wykonany po pierwszym sortowaniu FACS komórek GFP-P2A-AMPK (oznaczenie wykonane jednokrotnie). Panel B – Western Blot wykonany po drugim sortowaniu komórek GFP-P2A-AMPK. Uśrednione wyniki z dwóch niezależnych oznaczeń, analiza ilościowa przeprowadzona w oparciu o densytometrię specyficznych prążków GFP i AMPK $\alpha$  względem genu referencyjnego GAPDH, gwiazdką zaznaczono istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

Na Rycinie 5-22 pokazano zdjęcia mikroskopowe przedstawiające fluorescencję linii HTB-35 GFP-P2A-AMPK w porównaniu do komórek „typu dzikiego”. Widoczna zielona fluorescencja wszystkich komórek, z których składa się przedstawiona kolonia.

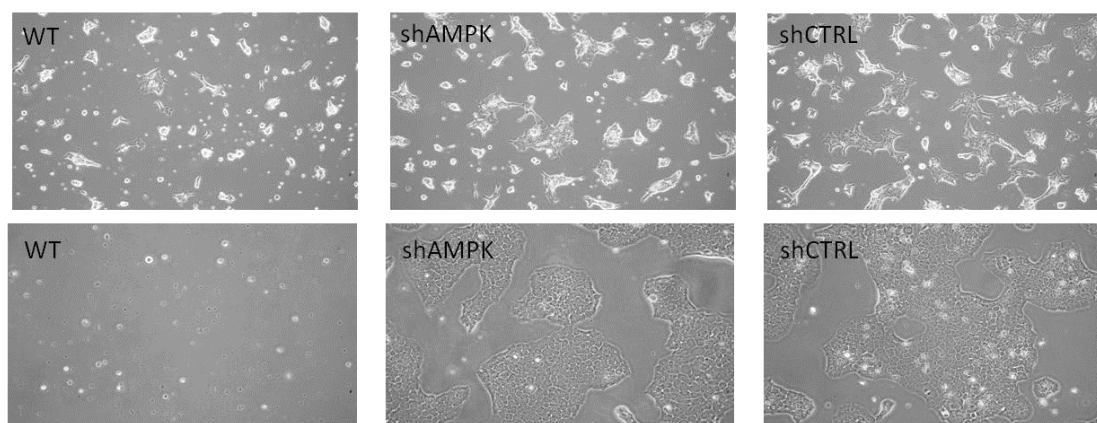


Rycina 5-22. Zdjęcia mikroskopowe pokazujące wyslekcjonowaną i sortowaną linię HTB-35 GFP-P2A-AMPK w porównaniu do komórek HTB-35 „typu dzikiego” (niezmodyfikowanych). Widoczna zielona fluorescencja komórek linii GFP-P2A-AMPK.

### 5.3. Uzyskanie linii komórkowej o obniżonej ekspresji podjednostki $\alpha$ kinazy AMPK

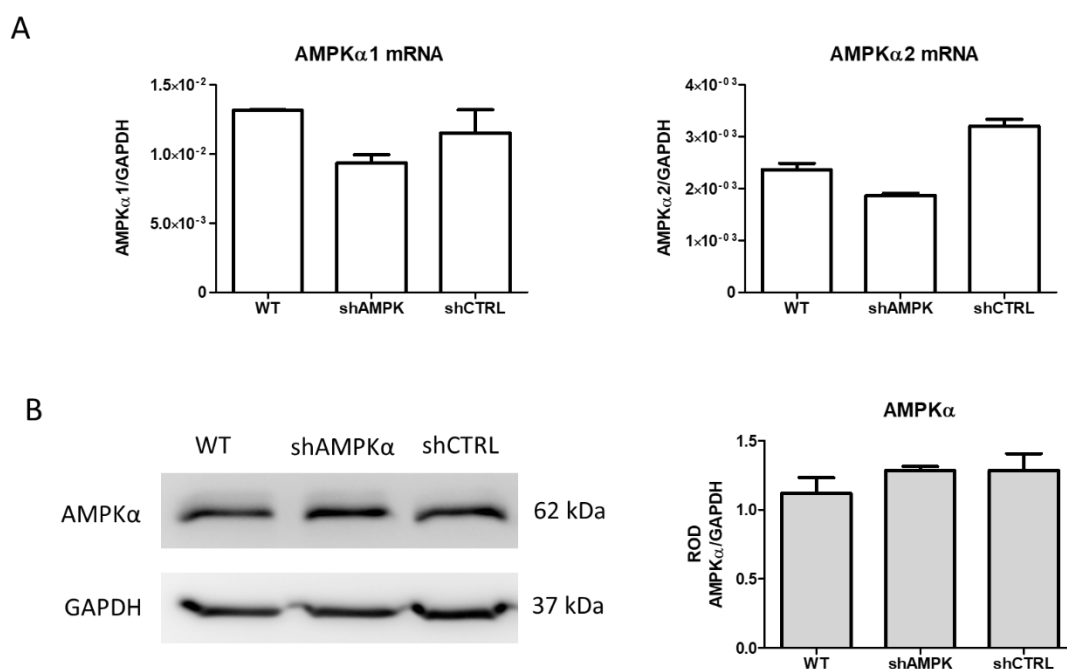
#### 5.3.1. Transdukcja linii komórkowej C-4I wirusem wyciszającym AMPK $\alpha$

W celu uzyskania linii C-4I z obniżoną ekspresją podjednostki katalitycznej  $\alpha$  kinazy AMPK zainfekowano komórki C-4I komercyjnie dostępnym lentiwirusem wprowadzającym do genomu komórek sekwencję shRNA. Użyto wirusa, którego sekwencja shRNA skierowana była przeciwko obydwu izoformom podjednostki AMPK $\alpha$ . Oprócz właściwej linii C-4I shAMPK $\alpha$  wyprowadzono również linię kontrolną z wprowadzoną do genomu sekwencją shRNA niewyciszającą żadnego znanego transkryptu (linia C-4I shCTRL). Na Rycinie 5-23 pokazano etapy wyprowadzania zmodyfikowanych linii C-4I. Na lewym dolnym zdjęciu widoczny brak komórek WT (nietransdukowanych), co świadczy o prawidłowo przeprowadzonej selekcji antybiotykowej.



Rycina 5-23. Wynik selekcji komórek C-4I transdukowanych lentiwirusem wyciszającym podjednostkę katalityczną  $\alpha$  kinazy AMPK (środkowa kolumna) oraz wirusem niewyciszającym żadnego znanego transkryptu (prawa kolumna). Górne zdjęcia przedstawiają komórki 5 dni po rozpoczęciu selekcji antybiotykowej. Dolne środkowe i prawe zdjęcie przedstawiają komórki po zakończeniu selekcji (15 dni od rozpoczęcia selekcji).

Wyprowadzone linie C-4I shAMPK $\alpha$  i shCTRL sprawdzono pod kątem wyciszenia obu izoform podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ . Metodą PCR w czasie rzeczywistym oznaczono ekspresję AMPK $\alpha$ 1 i AMPK $\alpha$ 2 na poziomie mRNA (Rycina 5-24A). Niestety, nie wykryto istotnych statystycznie różnic w poziomie transkryptu AMPK $\alpha$ 1 i AMPK $\alpha$ 2 pomiędzy wyprowadzonymi liniami a komórkami *typu dzikiego*. Pomimo tego sprawdzono czy występuje jakiegokolwiek wyciszenie ekspresji podjednostek AMPK $\alpha$  na poziomie białka, do czego wykorzystano metodę Westrn Blot (Rycina 5-24B). Analiza ekspresji białka AMPK $\alpha$  jednoznacznie wykazała brak jakichkolwiek zmian w ekspresji.

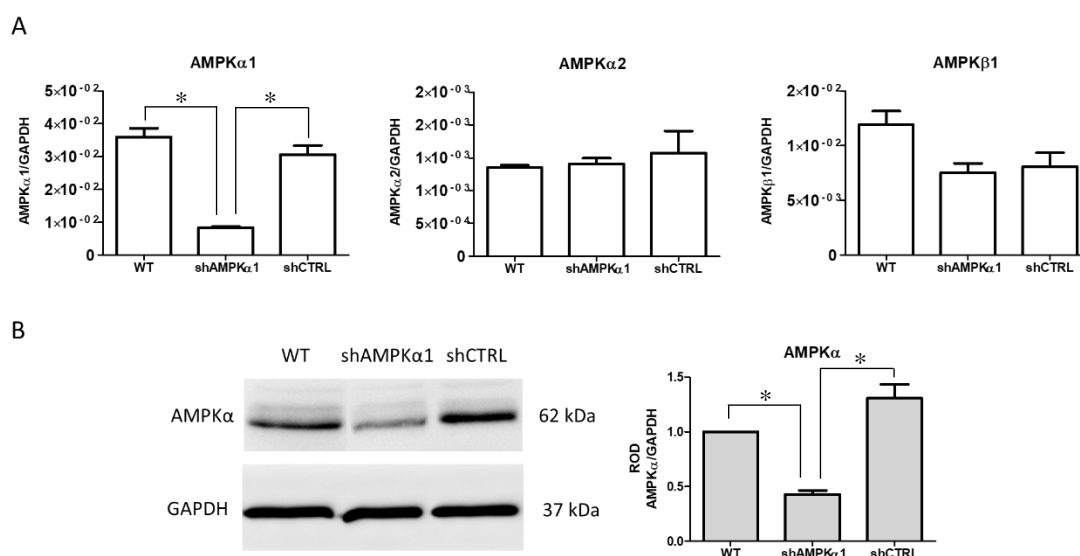


Rycina 5-24. Wyciszenie ekspresji podjednostki katalitycznej  $\alpha$  kinazy AMPK w modyfikowanych komórkach C-4I. Panel A – ocena ekspresji na poziomie transkryptu metodą PCR w czasie rzeczywistym. Widoczne pewne obniżenie poziomu ekspresji obudwu izoform podjednostki AMPK, które jednak nie jest istotne statystycznie. Wykresy przedstawiają uśrednione wartości z dwóch niezależnych oznaczeń  $\pm$  SD. Panel B – analiza wyciszenia podjednostki AMPK $\alpha$  na poziomie białka. Nie stwierdzono obniżenia poziomu białka podjednostki  $\alpha$ . Zdjęcia membran przedstawiają reprezentatywne wyniki dla dwóch niezależnych oznaczeń. Analiza ilościowa przeprowadzona w oparciu o densytometrię prążków AMPK $\alpha$  względem genu referencyjnego GAPDH.

### 5.3.2. Transdukcja linii komórkowej C-4I wirusem wyciszającym AMPK $\alpha$ 1

Wobec braku pozytywnego rezultatu wyciszenia podjednostki  $\alpha$ , postanowiono przeprowadzić kolejną próbę tej modyfikacji komórek C-4I używając innego lentiwirusa wprowadzającego shRNA skierowane przeciwko podjednostce AMPK $\alpha$ 1. Wyciszenie tylko izoformy  $\alpha$ 1 jest o tyle zasadne, iż w linii komórkowej HTB-35 podnoszono ekspresję też tylko tej izoformy. Obniżenie ekspresji podjednostki  $\alpha$ 1 (Rycina 5-26B) było dużo większe niż w przypadku poprzedniego lentiwirusa wyciszającego obydwie izoformy podjednostki  $\alpha$  (por. Rycina 5-25A). Dodatkowo stwierdzono, że wyciszenie

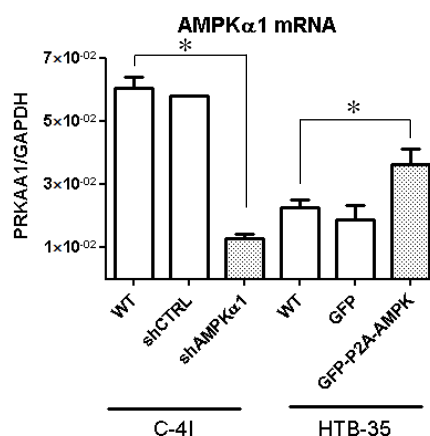
izoformy  $\alpha 1$  nie wpływa na ekspresję izoformy  $\alpha 2$ , a także nie wpływa na ekspresję podjednostki regulacyjnej AMPK $\beta 1$ , której poziom ekspresji pozostaje na takim samym poziomie jak w linii kontrolnej shCTRL. Wyciszenie AMPK $\alpha 1$  na poziomie transkryptu ma przełożenie na wyciszenie na poziomie białka oznaczone metodą Westrn Blot (*Rycina 5-25B*). Interesujący jest fakt, że wyciszenie na poziomie białka zaobserwowano dopiero po czwartym pasażu komórek od zakończenia selekcji.



*Rycina 5-25. Wyciszenie podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha 1$  w komórkach C-4I. Panel A - ocena ekspresji na poziomie transkryptu metodą PCR w czasie rzeczywistym. Widoczne obniżenie poziomu ekspresji izoformy 1 podjednostki AMPK $\alpha$ . Wykresy przedstawiają uśrednione wartości z dwóch niezależnych oznaczeń  $\pm$  SD, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ). Panel B – analiza wyciszenia podjednostki AMPK $\alpha$  na poziomie białka. Zdjęcia membran przedstawiają reprezentatywne wyniki dla dwóch niezależnych oznaczeń. Analiza ilościowa przeprowadzona w oparciu o densytometrię prążków AMPK $\alpha$  względem genu referencyjnego GAPDH, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).*

#### 5.4. Wpływ zmian w ekspresji i aktywacji podjednostki katalitycznej $\alpha$ kinazy AMPK na ekspresję markerów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym

Modyfikacje linii komórkowych modelu badawczego doprowadziły do wyciszenia podjednostki AMPK $\alpha$ 1 w komórkach C-4I i podniesienia ekspresji tej samej jednostki w komórkach linii HTB-35 (*Rycina 5-26*). Badania wpływu zmian ekspresji podjednostki  $\alpha$  kinazy AMPK na ekspresję markerów związanych z EMT przeprowadzono na sześciu liniach komórkowych – do każdej linii genetycznie zmodyfikowanej dołączono linię komórek *typu dzikiego* (WT) i linię kontrolną modyfikacji genetycznej (C-4I shAMPK $\alpha$ 1 i HTB-35 GFP). Na poziomie mRNA występuje obniżenie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 w linii shAMPK $\alpha$ 1 poniżej poziomu ekspresji tej podjednostki w niemodyfikowanej linii HTB-35.

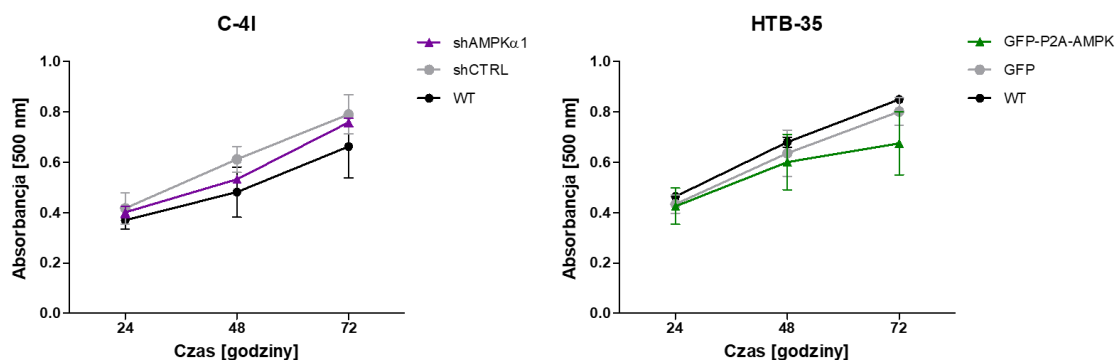


*Rycina 5-26. Oznaczenie ekspresji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1 w 6 liniach opracowanego modelu. Wykres przedstawia uśrednione wartości relatywnej ekspresji AMPK $\alpha$ 1 względem genu referencyjnego GAPDH z dwóch niezależnych oznaczeń  $\pm$  SD, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ )*

##### 5.4.1. Proliferacja zmodyfikowanych linii komórkowych RSM

Oznaczono proliferację zmodyfikowanych genetycznie komórek modelu RSM (*Rycina 5-27*). Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w proliferacji komórek w obrębie linii C-4I jak i HTB-35. Pomimo tego można zaobserwować pewne obniżenie się tempa wzrostu komórek linii HTB-35 GFP-P2A-AMPK.



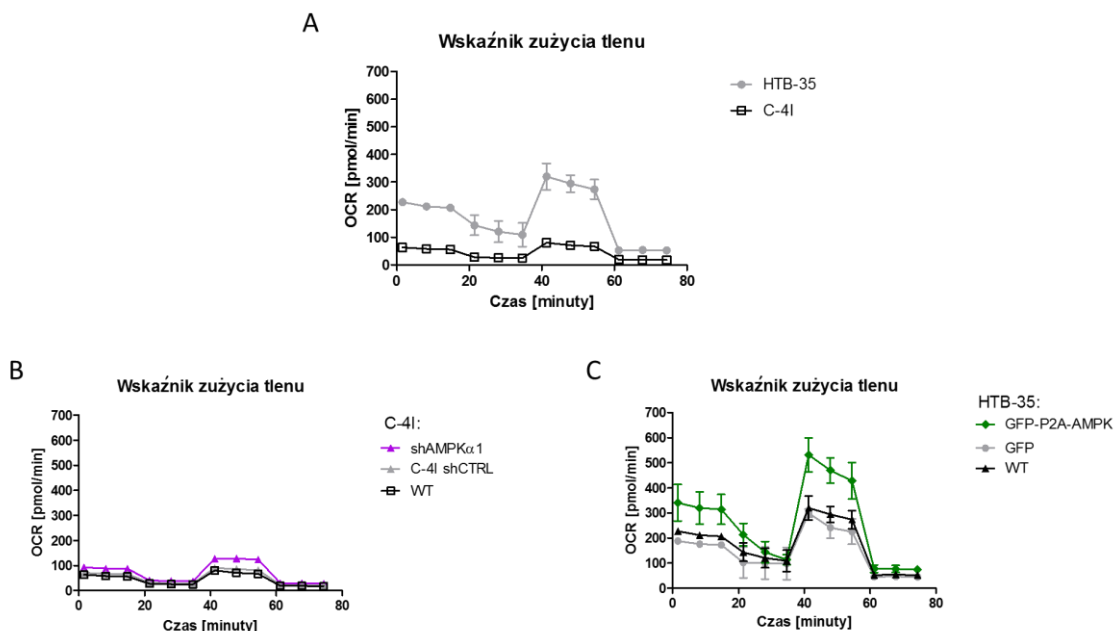


Rycina 5-27. Oznaczenie proliferacji komórek zmodyfikowanych linii C-4I i HTB-35 metodą MTS. W czasie 72 godzin nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic we wzroście linii komórkowych. Widoczny jest jednak pewne obniżenie tempa proliferacji dla komórek HTB-35 GFP-P2A-AMPK w punkcie czasowym 72 godziny. Punkty na wykresie prezentują uśrednione wartości absorbancji z 3 powtórzeń  $\pm$  SD.

#### 5.4.2. Zużycie tlenu przez komórki RSM

Oznaczenia wskaźników zużycia tlenu wykazało wyższe zapotrzebowanie na tlen inwazyjnej linii HTB-35 względem linii C-4I. Zwiększona konsumpcja tlenu (przedstawiona na wykresie w czasie pomiędzy 40 a 60 minutą) jest charakterystyczna dla linii nowotworowych i wiąże się z wyższą odpornością m.in. na stres oksydacyjny i niekorzystne warunki środowiska.

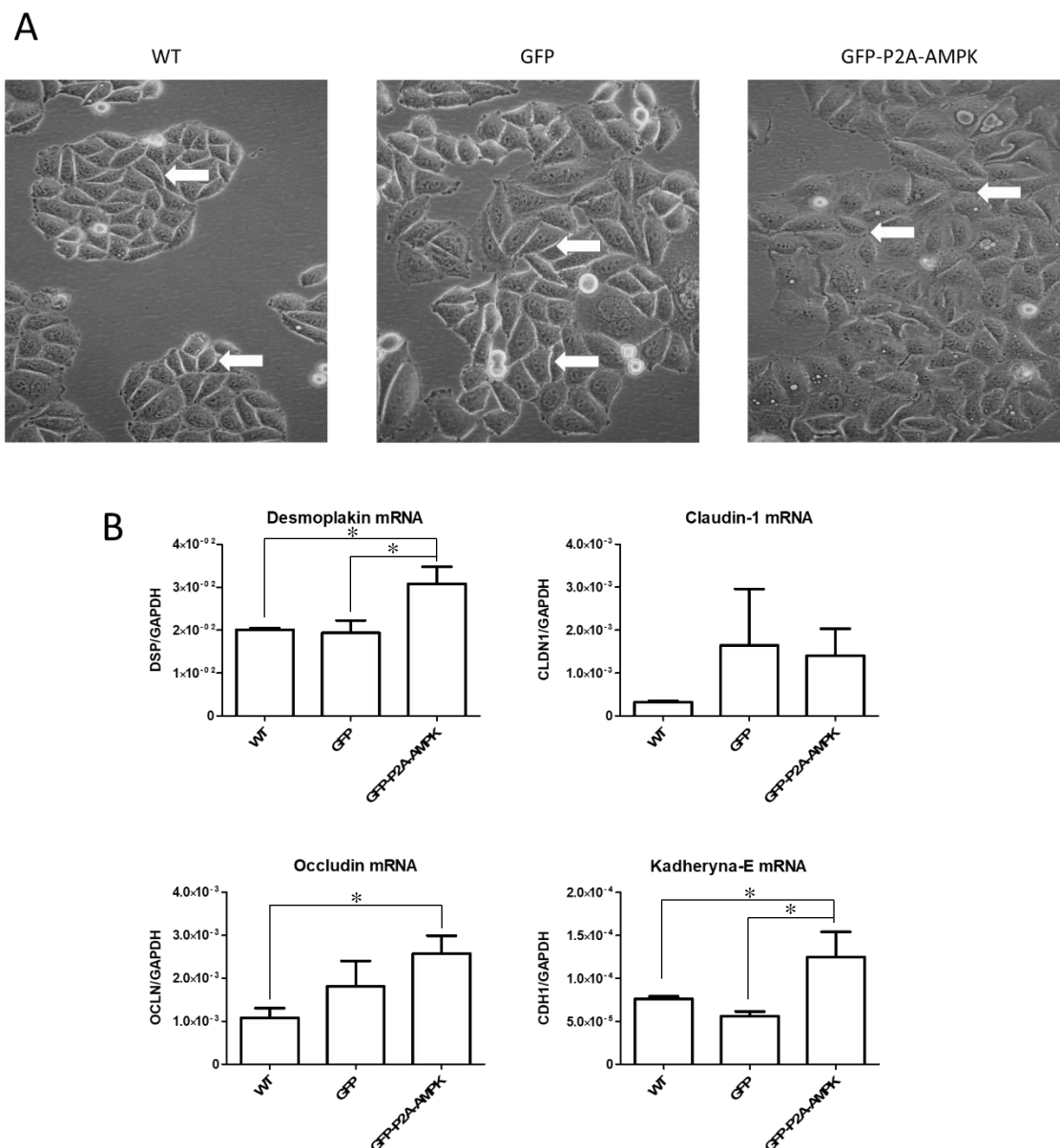
Modyfikacja w zakresie ekspresji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1 - zarówno obniżenie jak i podwyższenie jej ekspresji w odpowiednich liniach, powoduje zwiększenie zapotrzebowania na tlen. Wzrost wskaźnika zużycia tlenu korespondujący ze zwiększeniem możliwości adaptacyjnych do niekorzystnych warunków jest jednak dużo niższy w przypadku linii komórkowych C-4I i pozostaje na znacznie niższym poziomie niż niezmodyfikowane komórki HTB-35 (Rycina 5-29B i C). Komórki HTB-35 GFP-P2A-AMPK charakteryzują się najwyższym wskaźnikiem zapotrzebowania na tlen spośród wszystkich ocenianych linii modelu komórkowego.



Rycina 5-28. Oznaczenie zużycia tlenu przez komórki RSM. Zapotrzebowanie na tlen oznaczono na aparacie Seahorse porównując zarówno niezmodyfikowane linie komórkowe modelu kmórkowego RSM – C4I do HTB-35 (Panel A) jak i uzyskane modyfikowane linie do wyjściowych linii komórkowych typu dzikiego (Panel B i C).

#### 5.4.3. Właściwości molekularne komórek HTB-35 o podwyższonej ekspresji AMPK $\alpha$ 1

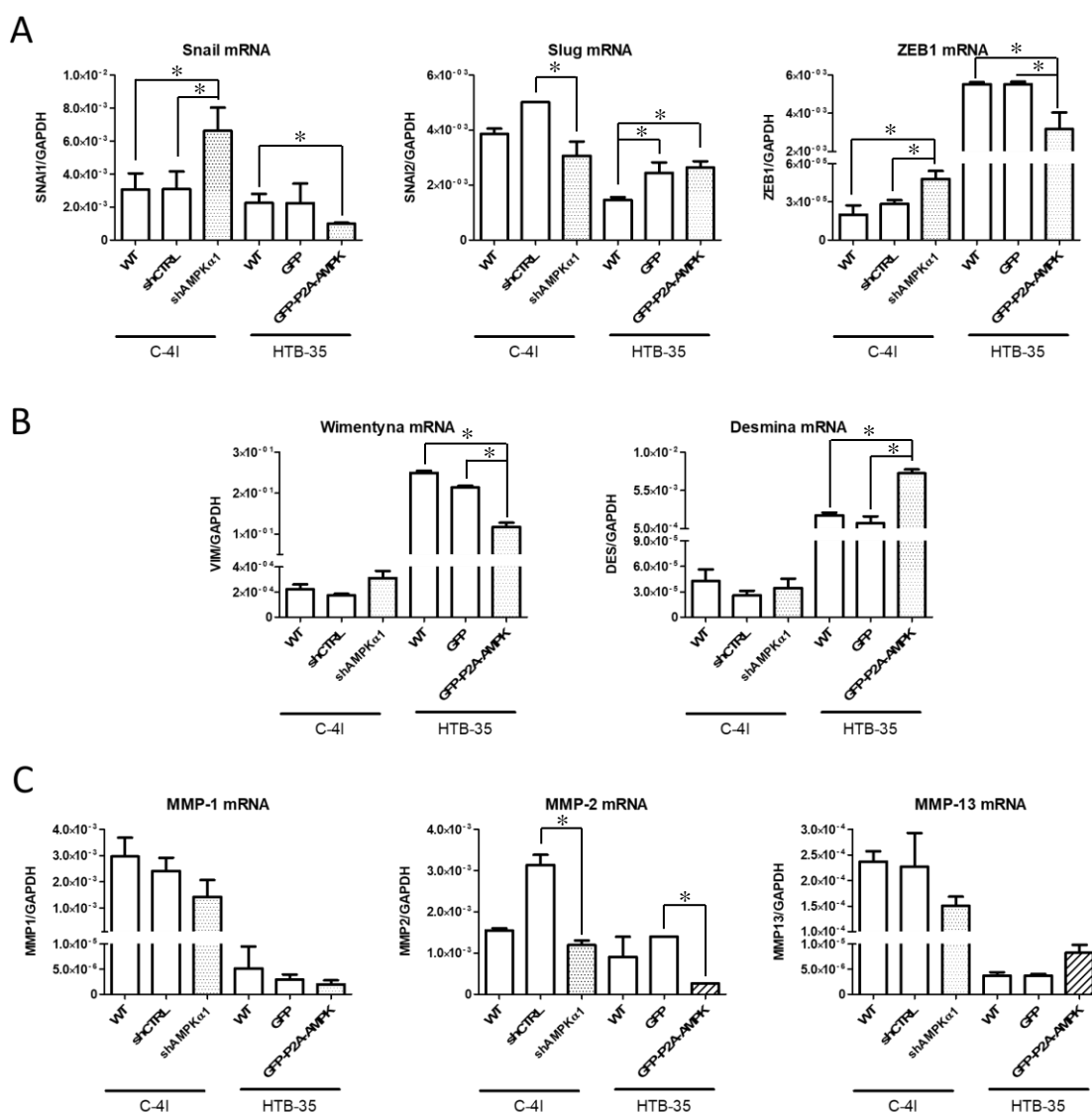
W wyprowadzonych liniach HTB-35 zaobserwowano wyraźne różnice w wyglądzie komórek tworzących kolonie linii HTB-35 GFP-P2A-AMPK. Zaobserwowane różnice w morfologii komórek dotyczyły przede wszystkim wyglądu połączeń międzykomórkowych (Rycina 5-29A). W związku z tym postanowiono ocenić ekspresję białek odpowiedzialnych za tworzenie połączeń międzykomórkowych (Rycina 5-29B). Wyniki badania ekspresji wykazały, że linia HTB-35 GFP-P2A-AMPK charakteryzuje się istotnie wyższą ekspresją niektórych białek tworzących połączenia typu tight-junction oraz białka adhezyjnego Kadheryny E (które jest także głównym markerem fenotypu epithelialnego).



Rycina 5-29. Wpływ zwiększenia ekspresji *AMPK $\alpha$ 1* w komórkach HTB-35 na połączenia komórkowe. Panel A – wizualna ocena zmian komórek HTB-35 modyfikowanych genetycznie. Widoczne zmiany w wyglądzie połączeń komórkowych (przykładowe zaznaczone strzałkami). Powiększenie 200x. Panel B – analiza ekspresji mRNA białek wchodzących w skład połączeń komórkowych. Wykresy reprezentują względną ekspresję oznaczanego genu w stosunku do genu referencyjnego *GAPDH*  $\pm$  SD. Oznaczenie wykonano dwukrotnie, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.4. Markery molekularne przejścia epitelialno-mezenchymalnego w komórkach RSM

Opracowany model komórkowy RSM zawierający linie komórkowe ze zmodyfikowaną ekspresją AMPK $\alpha$  pozwolił na ocenę ekspresji czynników związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym. Sprawdzano zarówno czynniki transkrypcyjne, których działanie jest związane z implementacją EMT, jak też zmiany markerów fenotypu mezenchymalnego czy też innych czynników związanych z procesami towarzyszącymi EMT jak trawienie błony podstawnej czy modelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej.



Rycina 5-30. Ocena wpływu modyfikacji ekspresji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1 na ekspresję czynników związanych z EMT. Panel A – ekspresja mRNA czynników

---

*transkrypcyjnych związanych z indukcją przejścia epitelilno-mezenchymalnego. Panel B – ekspresja mRNA markerów fenotypu mezenchymalnego. Panel C – ekspresja mRNA metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej pośrednio związanych z EMT.*

*Wykresy reprezentują uśrednione dane z dwóch niezależnych oznaczeń względnej ekspresji oznaczanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH  $\pm$  SD, gwiazdką oznaczono wybrane istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).*

Uzyskane wyniki pokazują występowanie istotne różnic czynników związanych z EMT w badanych liniach. Szczególnie wyraźne są one dla czynników transkrypcyjnych Snail i ZEB-1 (odpowiedzialnych za implementację EMT), gdzie ich ekspresja koresponduje ze zmianami ekspresji AMPK $\alpha$  zarówno w linii C-4I jak i HTB-35 (*Rycina 5-30A*). W linii C-4I shAMPK $\alpha$ 1 ekspresja Snail i ZEB-1 była wyższa niż w linii niezmodyfikowanej i linii kontrolnej shCTRL, natomiast dokładnie przeciwny efekt jest widoczny w linii HTB-35 GFP-P2A-AMPK – podniesienie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 obniża ekspresję tych czynników transkrypcyjnych.

Podniesienie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 w linii HTB-35 powoduje także obniżenie głównego markera mezenchymalnego jakim jest wimentyna, czyli przywraca epitelialne właściwości komórek. Należy jednak zauważyć, że odwrotny efekt występuje dla innego markera mezenchymalnego – desminy (*Rycina 5-30B*).

Otrzymane wyniki dotyczące zmian ekspresji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej są niejednoznaczne (*Rycina 5-30C*). W większości przypadków nie znaleziono istotnych statystycznie różnic. Widoczny jest pewien efekt dla MMP-2, natomiast jest on taki sam dla linii C-4I shAMPK $\alpha$ 1 jak i przeciwstawnej HTB-35 GFP-P2A-AMPK, i wiąże się z obniżeniem ekspresji tej metaloproteinazy względem linii kontrolnych.

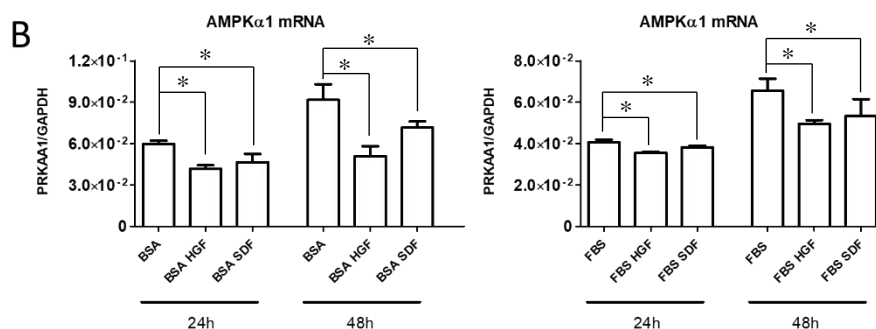
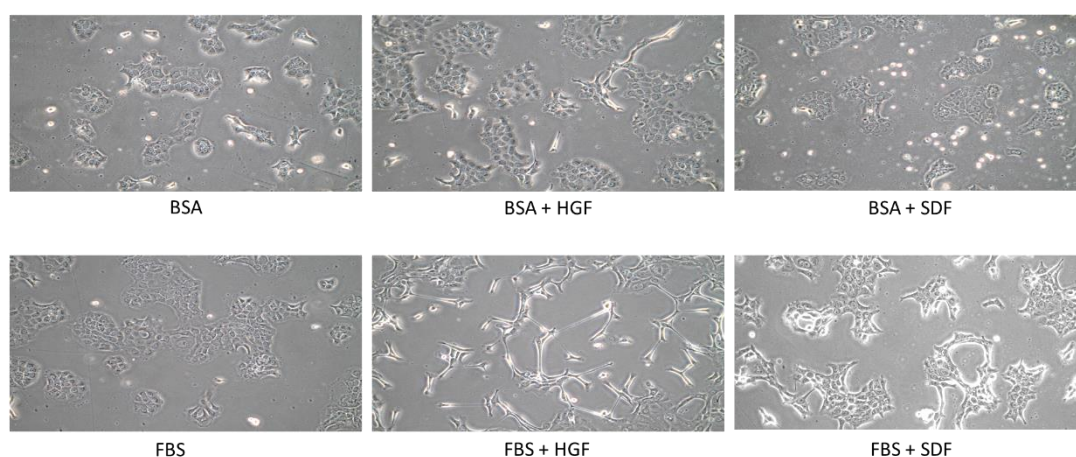
### 5.5. Wpływ czynników związanych z EMT na ekspresję i aktywację AMPK

Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) i czynnik pochodzenia stromalnego (SDF-1) są znanymi induktorami przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Jednym z założeń projektu doktorskiego było sprawdzenie wpływu tych czynników na ekspresję i aktywację podjednostki  $\alpha$  kinazy AMPK w komórkach RSM.

### 5.5.1. Zmiany fenotypowe i molekularne w komórkowej C-4I pod wpływem stymulacji czynnikami HGF i SDF-1

Długotrwała (24-godzinna) inkubacja komórek C-4I z czynnikami HGF i SDF-1 miała wpływ na zmiany fenotypu komórek (hodowle z 10% FBS), które były szczególnie widoczne w przypadku działania czynnika HGF. Sprawdzone czy zmiany fenotypowe są powiązane z ekspresją i aktywacją AMPK $\alpha$ . Ocena ekspresji transkryptu podjednostki AMPK $\alpha$ 1 metodą PCR w czasie rzeczywistym wykazała istnienie istotnych statystycznie różnic w ekspresji tej podjednostki pod wpływem działania czynników indukujących EMT po 48-godzinnej stymulacji. Obniżenie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 jest szczególnie dobrze widoczna po 48-godzinnej inkubacji z HGF jak i SDF-1 w medium pozbawionym surowicy, jakkolwiek są zachowane także w standardowych warunkach hodowlanych (10% FBS).

A



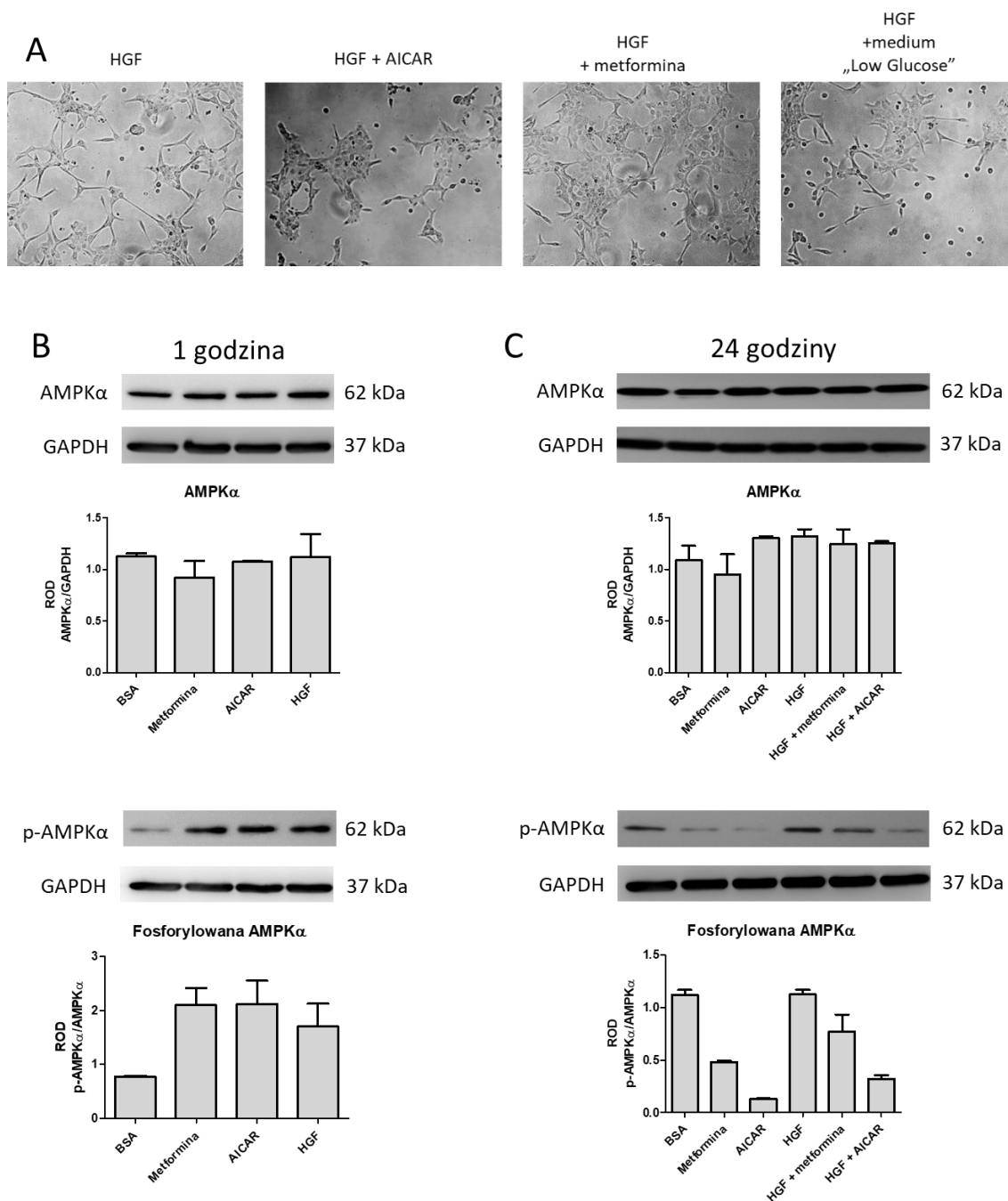
Rycina 5-31. Wpływ czynników HGF i SDF-1 na fenotyp komórek C-4I i ekspresję transkryptu podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1. Panel A – wizualna ocena zmian fenotypu komórek C-4I pod wpływem 24-godzinnej inkubacji z HGF i SDF-1, zarówno w

---

medium zawierającym 0,5% BSA jak i 10% FBS. Panel B – oznaczenie poziomu transkryptu AMPK $\alpha$ 1 po 24-godzinnej i 48-godzinnej inkubacji z HGF i SDF-1. Wykresy reprezentują uśrednione dane z dwóch niezależnych oznaczeń względnej ekspresji oznaczanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH  $\pm$  SD, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

#### 5.5.2. Wpływ czynnika HGF na ekspresję i aktywację AMPK $\alpha$ w komórkach RSM

Po otrzymaniu wyników z długotrwałej inkubacji komórek z HGF, pokazujących jego wpływ na poziom transkryptu podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ , postanowiono sprawdzić ekspresję i aktywację tej podjednostki metodą Western Blot. Zdecydowano się użyć aktywatorów AMPK: metforminy i AICAR jako kontroli aktywacji tej kinazy. Zaskakująco, okazało się, że podczas jednoczesnej inkubacji komórek C-4I z HGF i AICAR nie obserwowano zjawiska rozchodzenia się komórek i zmianę fenotypu w stronę fenotypu mezenchymalnego (Rycina 5-32A). Podobny, aczkolwiek słabszy efekt obserwowano podczas inkubacji komórek z HGF i metforminą. Sprawdzone także niefarmakologiczną drogę aktywacji AMPK, a mianowicie niskie stężenie glukozy. Stwierdzono, że także tutaj zjawisko rozchodzenia się komórek też był do pewnego stopnia hamowany. Ocena zmian na poziomie białka po jednogodzinnej inkubacji przedstawia Panel B Ryciny 5-32, a po 24-godzinnej inkubacji Panel C. Niezależnie od czasu inkubacji, nie obserwowano zmian w ilości białka AMPK $\alpha$ , natomiast widoczne były różnice w aktywności tej podjednostki. Bardzo interesujący wynik otrzymano dla 24-godzinnej inkubacji, ponieważ pokazuje on, że w komórkach C-4I inkubowanych z farmakologicznymi aktywatorami AMPK, aktywność podjednostki katalitycznej  $\alpha$  jest - paradoksalnie - wyciszana. Ponadto, efekt ten był częściowo odwrócony poprzez działanie HGF (Rycina 5-32C).



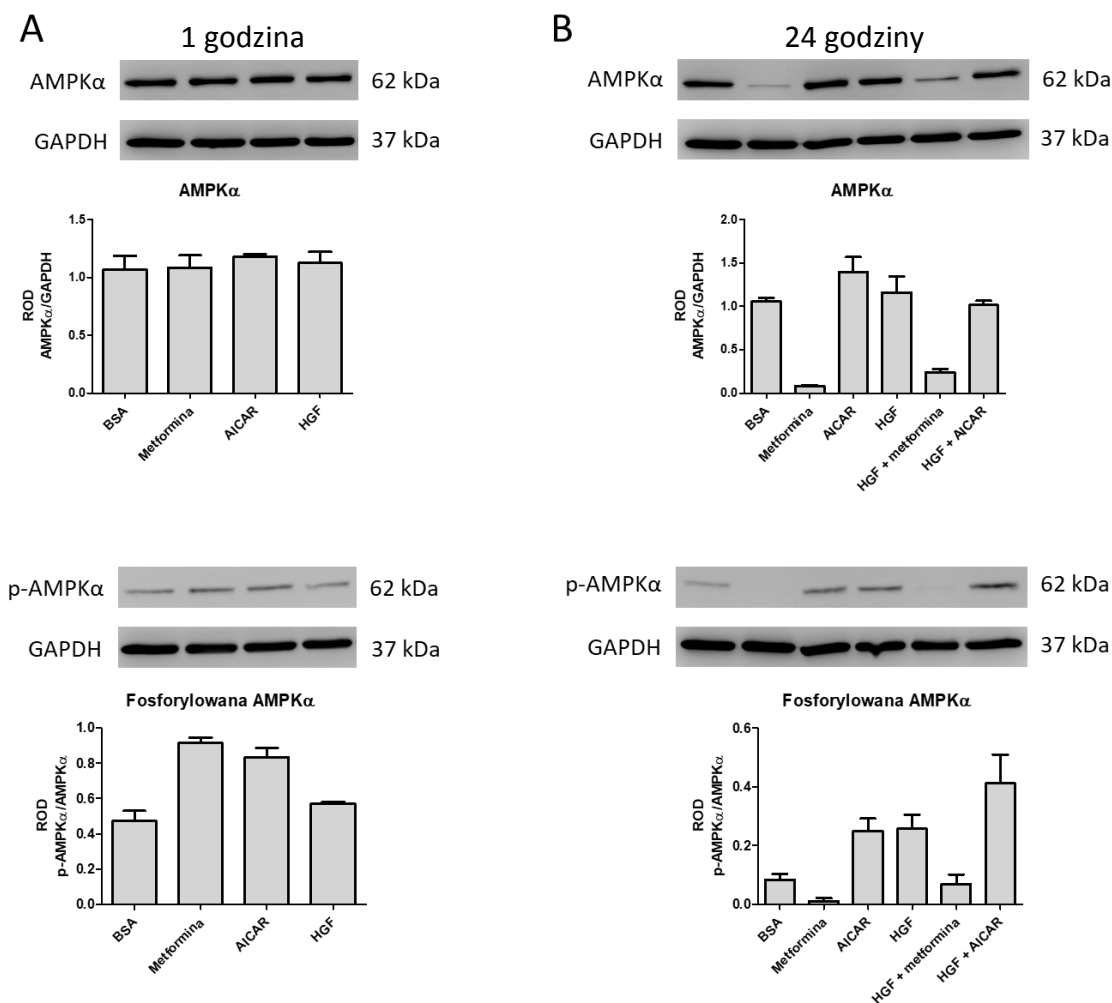
Rycina 5-32. Oznaczenie ekspresji i aktywacji białka AMPK $\alpha$  pod wpływem inkubacji z HGF oraz chemicznymi aktywatorami kinazy AMPK w komórkach C-4I. Panel A – wizualna ocena zmian fenotypu komórek C-4I pod wpływem 24 godzinnej jednoczesnej inkubacji z czynnikiem HGF i aktywatorami kinazy AMPK: AICAR i metforminą. Dodatkowo oceniano wpływ fizjologicznej aktywacji kinazy AMPK niskim stężeniem glukozy na zmianę efektu inkubacji komórek C-4I z HGF. Panel B – Ocena ekspresji i aktywacji podjednostki AMPK $\alpha$  po 1-godzinnej inkubacji z HGF oraz aktywatorami kinazy AMPK. Panel C – ocena ekspresji i aktywacji podjednostki AMPK $\alpha$  po 24-



---

godzinnej inkubacji z HGF oraz aktywatorami kinazy AMPK. Zdjęcia membran przedstawiają reprezentatywne wyniki dla dwóch niezależnych oznaczeń. Uśrednione wyniki ilościowe  $\pm$  SD przedstawione na wykresach słupkowych oparto o densytometrię prążków analizowanego genu względem genu referencyjnego GAPDH, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

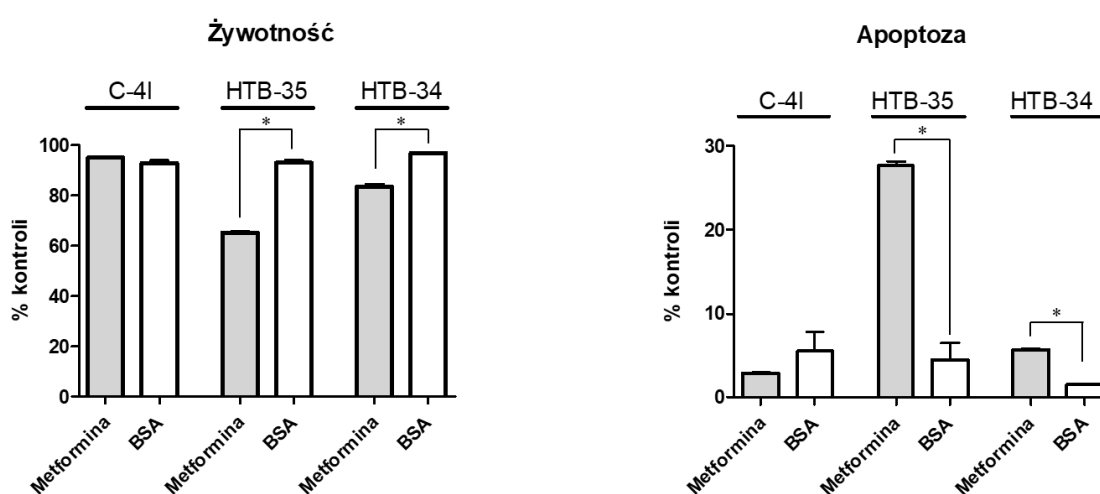
W przypadku komórek HTB-35, 24-godzinna inkubacja z metforminą w stężeniu 10 mM prowadzi do śmierci części komórek. Analiza uzyskanego po 24 godzinach białka ze względu na charakterystykę metody jego izolacji („odpłukanie” nieżywych komórek zawieszonych w medium hodowlanych) wykazała, że komórki które nie zostały „odpłukane” charakteryzowały się bardzo niską ekspresją AMPK $\alpha$ . Dodatkowo, w komórkach tych praktycznie nie wykryto aktywnej (fosforylowanej) formy AMPK $\alpha$  (Rycina 5-36B).



Rycina 5-33. Oznaczenie ekspresji i aktywacji białka AMPK $\alpha$  pod wpływem inkubacji z HGF oraz chemicznymi aktywatorami kinazy AMPK w komórkach HTB-35. Panel A – Ocena ekspresji i aktywacji podjednostki AMPK $\alpha$  po 1-godzinnej inkubacji z HGF oraz aktywatorami kinazy AMPK. Panel B – ocena ekspresji i aktywacji podjednostki AMPK $\alpha$  po 24-godzinnej inkubacji z HGF oraz aktywatorami kinazy AMPK. Zdjęcia membran przedstawiają reprezentatywne wyniki dla dwóch niezależnych oznaczeń. Uśrednione wyniki ilościowe  $\pm$  SD przedstawione na wykresach słupkowych oparto o densytometrię prążków analizowanego genu względem genu referencyjnego GAPDH, gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.3. Wpływ długotrwałej aktywacji AMPK na żywotność komórek RSM

Wyniki cytofluorymetrycznej oceny żywotności i indukcji apoptozy w komórkach RSM po 24-godzinnej inkubacji komórek z aktywatorem AMPK jakim jest metformina przedstawiono na *Rycinie 5-34*. Wykazano, że istotnemu obniżeniu ulega żywotność komórek HTB-35 oraz komórek HTB-34. Obniżenie żywotności koresponduje z jednoczesną indukcją apoptozy w tych komórkach.



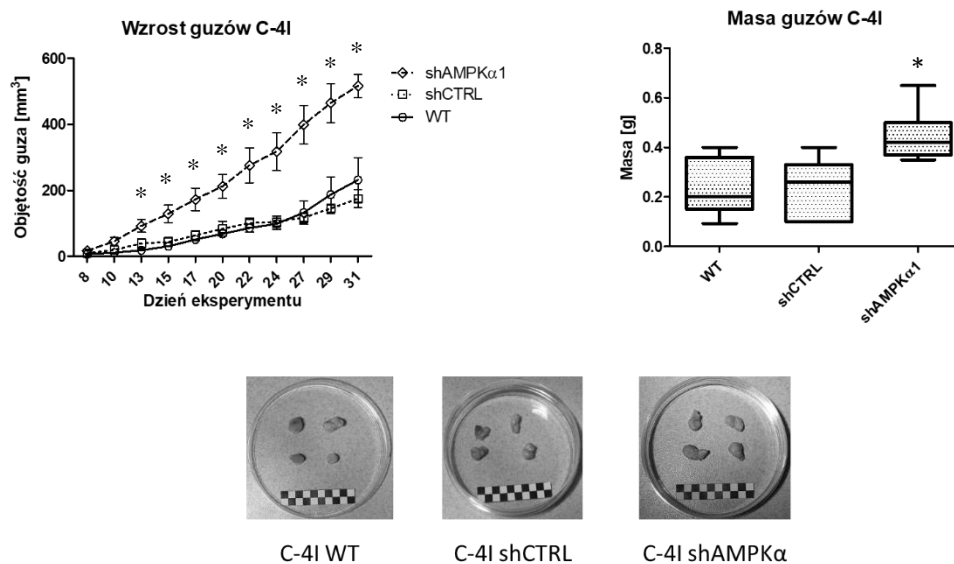
*Rycina 5-34. Cytofluorymetryczna ocena żywotności oraz indukcji apoptozy w komórkach RSM pod wpływem 24-godzinnej inkubacji z metforminą. Oznaczenia wykonano w 2 powtórzeniach, wykresy przedstawiają uśrednione dane  $\pm$  SD, gwiazdką zaznaczono różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ).*

### 5.6. Wpływ zmian w ekspresji kinazy AMPK na zdolność komórek nowotworowych do tworzenia guzów i przerzutowania w modelu mysim NOD-SCID

#### 5.6.1. Wzrost guzów z komórek linii C-4I

Komórki C-4I po podskórnym podaniu do myszy NOD-SCID wykazywały zdolność do tworzenia guzów. Występowały jednak istotne różnice w tempie wzrostu guzów pochodzących od różnych linii. Najszybciej rosnące guzy obserwowano w myszach

szczepionych komórkami w których obniżono ekspresję podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$ 1. Po wyizolowaniu guzów po zakończeniu eksperymenty stwierdzono, że masa guzów utworzonych przez komórki tej linii jest również istotnie większa.



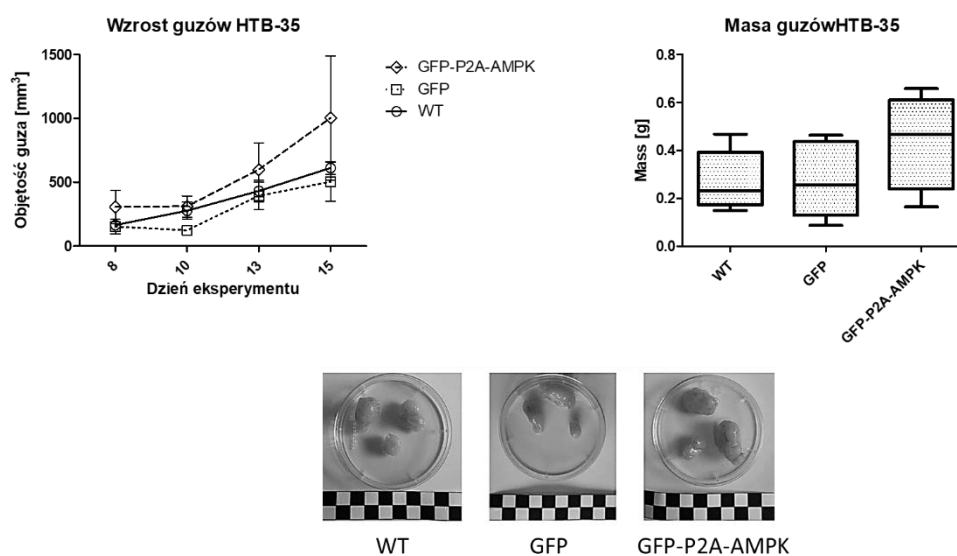
Rycina 5-35. Tworzenie guzów przez podane podskórnie komórki C-4I WT, C-4I shCTRL i C-4I shAMPK w modelu mysim NOD-SCID. Panel A – objętościowy wzrost guzów w czasie obliczony z wyników przekórnych pomiarów guza. Wykres przedstawia uśrednione dane z 2 eksperymentów (2 x n=4 dla każdej linii komórkowej)  $\pm$  SD, gwiazdką zaznaczono różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Panel B – wykres ramkowy obrazujący masę wyizolowanych guzów dla każdej z trzech linii C-4I  $\pm$  SD, gwiazdką zaznaczono różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ). Panel C – wizualna ocena wielkości wyizolowanych guzów. Zamieszczona skala porównawcza: czarno-białe kwadraty o boku  $a = 5\text{mm}$ .

### 5.6.2. Zdolność komórek linii C-4I do tworzenia przerzutów

Po wykonaniu oznaczeń metodą PCR w czasie rzeczywistym, stwierdzono brak obecności ludzkiego genu  $\beta$ -aktyny w próbkach RNA wyizolowanych od myszy szczepionych komórkami C-4I. Oznacza to brak możliwości tworzenia przerzutów przez komórki linii C-4I, zarówno komórki „typu dzikiego” jak i zmodyfikowane genetycznie.

## 5.6.3. Wzrost guzów z komórek linii HTB-35

Wzrost guzów tworzonych przez komórki linii HTB-35 przedstawia *Rycina 5-36*. Komórki wszystkich linii HTB-35 charakteryzowały się szybszym wzrostem w modelu mysim NOD-SCID niż komórki linii C-4I, dlatego czas eksperymentu został skrócony do 15 dni. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic we wzroście i masie guzów, aczkolwiek można zaobserwować pewne przesunięcie mediany masy guzów HTB-35 GFP-P2A-AMPK w stronę wyższej masy, co jest również obserwowalne na wykresie pomiarów objętości guzów.

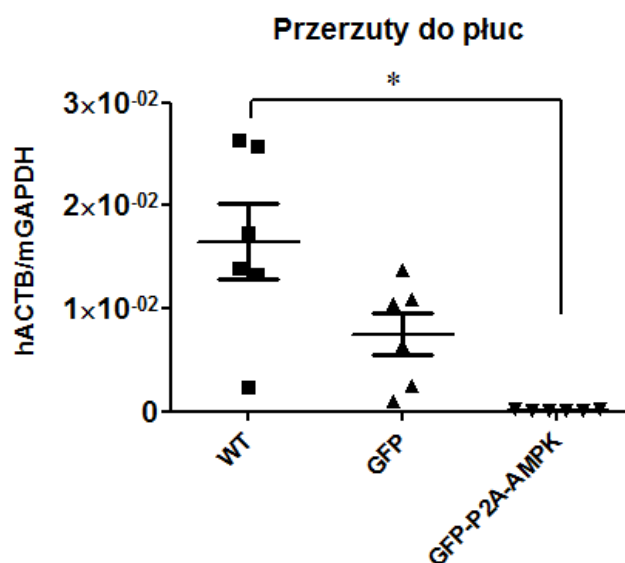


*Rycina 5-36. Tworzenie guzów przez podane podskórnie komórki HTB-35 WT, HTB-35 GFP i HTB-35 GFP-P2A-AMPK w modelu mysim NOD-SCID. Panel A – objętościowy wzrost guzów w czasie obliczony z wyników przezskórnych pomiarów guza. Wykres przedstawia uśrednione dane z 2 eksperymentów (2 x n=3 dla każdej linii komórkowej) ± SD. Panel B – wykres ramkowy obrazujący masę wyizolowanych guzów dla każdej z trzech linii HTB-35. Panel C – wizualna ocena wielkości wyizolowanych guzów. Zamieszczona skala porównawcza: czarno-białe kwadraty o boku a =5mm*

## 5.6.4. Zdolność komórek linii HTB-35 do tworzenia przerzutów

Zdolność komórek HTB-35 do tworzenia przerzutów weryfikowano metodą PCR w czasie rzeczywistym, poszukując w pobranych od myszy próbkach płuc, śledziona i

szpiku transkryptu ludzkiej  $\beta$ -aktyny. Wykazano obecność tego transkryptu w próbkach płuc, co jest wynikiem zasiedlenia się w płucach ludzkich komórek HTB-35. Analiza ilościowa wskazała, że ilość transkryptu w płucach myszy szczepionych komórkami linii GFP-P2A-AMPK była istotnie niższa niż u myszy szczepionych komórkami „typu dzikiego” (Rycina 5-37). Warto zaznaczyć, że ilość transkryptu  $\beta$ -aktyny w płucach myszy szczepionych GFP-P2A-AMPK dla wszystkich próbek pozostawała na bardzo niskim poziomie, co jest widoczne na wykresie.



Rycina 5-37. Oznaczenie poziomu transkryptu genu ludzkiej  $\beta$ -aktyny w próbkach płuc pochodzących od myszy szczepionych podskórnie komórkami HTB-35. Zdolność do tworzenia przerzutów jest wprost proporcjonalna do ilości transkryptu genu ludzkiej  $\beta$ -aktyny względem mysiego genu GAPDH. Wykres reprezentuje dane z dwóch niezależnych eksperymentów  $\pm$  SD ( $2 \times n=3$  dla każdej linii komórkowej), gwiazdką oznaczono istotnie statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ).

## 6. Dyskusja

---

---

### 6.1. Ekspresja i aktywacja AMPK w różnych stopniach zaawansowania nowotworu.

Wybrane linie komórkowe RSM stanowiące model badawczy różnią się istotnie między sobą i wydają się być dobrym przykładem progresji przerzutowej raka szyjki macicy. C4-I reprezentują stopień I zaawansowania nowotworu, natomiast HTB-35 odpowiadają stopniowi II [18]. Jednym z procesów, który wchodzi w ogół zmian występujących podczas przerzutowania jest proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego [104]. Badania na rakiem szyjki macicy udowodniły, że to właśnie EMT odpowiada za jego progresję przerzutową [134]. Charakterystyka markerów epitelialnych i mezenchymalnych w liniach komórkowych C-4I i HTB-35, a także HTB-34 dokładnie odpowiada zmianom występującym podczas EMT [100]. Linia HTB-34, pochodząca z przerzutu, składa się z komórek, które po EMT przeszły proces odwrotny czyli MET (przejście mezenchymalno-epitelialne). Z tego względu była używana tylko porównawczo przy niektórych eksperymentach, a główny nacisk położono na linie C-4I i HTB-35, które dobrze przedstawiają nabywanie zdolności inwazyjnych poprzez implementację programu EMT. Pozwoliło to na dobre skorelowanie zmian w ekspresji i aktywacji kinazy AMPK ze zmianami zachodzącymi podczas EMT.

Wobec powyższego, linie komórkowe scharakteryzowano pod względem ekspresji różnych podjednostek kinazy AMPK, szczególny nacisk kładąc na podjednostkę katalityczną  $\alpha 1$  jako główną podjednostkę wykonawczą tej kinazy. Wykonane oznaczenia pozwoliły stwierdzić, że to właśnie ta podjednostka różnicuje linie względem siebie, podczas gdy ekspresja drugiej izoformy podjednostki  $\alpha$  (czyli  $\alpha 2$ ) nie różniła się pomiędzy liniami i jednocześnie była na dużo niższym poziomie niż  $\alpha 1$ . Także oznaczenie podjednostek  $\beta 1$  i  $\gamma 1$  nie wykazało istnienia różnic w ich ekspresji na poziomie RNA. Warto odnotować, że analiza ilościowa białka AMPK $\beta 1$  pokazuje różnicę pomiędzy komórkami C-4I a HTB-35 (wyższa ekspresja w C-4I) jednak nie przekłada się ona na ilość aktywnej formy tego białka – analiza statystyczna nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy ilością fosforylowanej formy AMPK $\beta 1$  pomiędzy liniami. Nie sprawdzano innych izoform podjednostek  $\beta$  i  $\gamma$ , co wynika z faktu, iż według danych literaturowych, to właśnie podjednostki  $\beta 1$  i  $\gamma 1$  są ekspresjonowane w tkance pochodzenia epitelialnego [135]. Analiza poziomu ekspresji izoform podjednostki  $\alpha$  również wydaje się jednoznacznie wskazywać, że to  $\alpha 1$  jest charakterystyczna dla komórek epitelialnych, co zgadza się z literaturą [136].



Oznaczenia poziomu ekspresji AMPK sugerują, że wyciszenie ekspresji tej kinazy jest skorelowane z nabywaniem zdolności inwazyjnych i wzrostem złośliwości komórek nowotworowych. Fakt ten znajduje potwierdzenie w literaturze. Chi-Wai Lee i wsp. wykazali spadek ekspresji w różnych liniach komórkowych raka wątroby [137]. W badaniach oznaczano ekspresję podjednostki  $\alpha 2$ , a nie  $\alpha 1$ , co jednak ma poparcie w danych literaturowych co do tkankowo specyficznej ekspresji różnych izoform podjednostek AMPK. Autorzy spróbowali określić przyczynę deregulacji ekspresji AMPK $\alpha 2$  w jednej z linii raka wątroby – HepG2. Wykazano że wyciszenie ekspresji AMPK $\alpha 2$  w komórkach HepG2 było związane z epigenetyczną modyfikacją, jaką była acetylacja histonów regionu promotora genu *PRKAA2* (kodującego AMPK $\alpha 2$ ). Inne doniesienia literaturowe demonstrują, że wyciszenie ekspresji AMPK $\alpha 2$  ma swoją przyczynę w delecji regionu chromosomu 1p31 kodującego tę podjednostkę [138]. Jest możliwe, że podobne zjawisko ma miejsce w przypadku inwazyjnej linii HTB-35, jako że jest ona opisywana jako obarczona dużymi rearanżacjami genomowymi [139]. W badaniach Chi-Wai Lee i wsp., udowodnili oni, że wyciszenie AMPK $\alpha 2$  poprzez wprowadzenie sekwencji shRNA skierowanej przeciwko tej podjednostce prowadzi do zwiększenia tempa proliferacji i wzrostu złośliwości tych komórek.

Oznaczenia wykonane dla modelu komórkowego, wykazały, że linie komórkowe C-4I i HTB-35 nie tylko różnią się ekspresją AMPK $\alpha 1$  ale również jej aktywacją. W linii C-4I, aktywacja AMPK $\alpha$  utrzymuje się natywnie na bardzo wysokim poziomie, natomiast w komórkach HTB-35 jest ponad dwukrotnie niższa. Różne doniesienia literaturowe wykazują, że w wielu typach nowotworów następuje wyciszenie aktywności AMPK [140]. Przeprowadzone przez S.M. Hadad i wsp. badania próbek histopatologicznych pochodzących od dwóch kohort pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem piersi (łącznie 354 próbki) pozwoliły skorelować obniżoną aktywność kinazy AMPK z rozwojem nowotworu [141]. We wszystkich przypadkach w tkankach guzów nowotworowych oznaczono istotnie niższą aktywność AMPK $\alpha$ , niż w otaczającej je prawidłowej tkance epitelialnej. Dodatkowo autorzy wykazali, że im większe obniżenia aktywności AMPK $\alpha$  tym wyższy stopień złośliwości nowotworu. Do podobnych wniosków doszli Badacze analizujący przypadki raka trzustki [142]. W analizie immunohistochemicznej preparatów histopatologicznych wykazali wyłączenie aktywacji AMPK $\alpha$  w komórkach nowotworowych, w przeciwieństwie do prawidłowego nabłonka, gdzie ta aktywność była wysoka.

Niestety stosunkowo mało jest badań analizujących bezpośrednio aktywność i/lub ekspresję kinazy AMPK w raku szyjki macicy. Jednym z takich badań, które skupia się na kinazie LKB1, czyli będącej bezpośrednim aktywatorem AMPK jest badanie S.N Wingo i wsp. [143]. Autorzy analizowali nagromadzenie mutacji somatycznych w regionie genu kodującego LKB1, które uniemożliwiały ekspresję właściwej formy tego białka. Logicznym wydaje się założenie, że pozbawienie komórek obecności jednej z kinaz regulujących aktywujących AMPK, będzie miało negatywny wpływ na jej aktywność. Co ciekawe, w przeprowadzonych badaniach określono, że zjawisko uszkodzenia sekwencji LKB1 jest dość częste, jako że występuje w więcej niż 20% przypadków RSM, natomiast jest związane z wyższą agresywnością nowotworu i gorszymi rokowaniami. Oprócz badania materiału histopatologicznego Autorzy przeanalizowali sekwencje genu *LKB1* w 9 liniach komórkowych RSM, m.in. C-4I i HTB-35, co wykazało, że w linii C-4I zmutowany jest tylko jeden z alleli, natomiast w HTB-35 obydwa allele kodujące LKB1. W kontekście przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badań nad aktywnością AMPK w liniach C-4I i HTB-35, może stanowić to jedną z możliwości wytłumaczenia występujących różnic.

Przytoczone badania histopatologiczne popierają postawioną tezę, że nabywanie zdolności inwazyjnych i wzrost stopnia złośliwości nowotworu jest pozytywnie skorelowane z ekspresją i aktywnością AMPK (a szczególnie AMPK $\alpha$ ) w RSM.

## 6.2. Wpływ ekspresji AMPK na proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego i przerzutowanie

Ponieważ wybrane linie C-4I i HTB-35 dobrze obrazują komórki znajdujące się na początkowym i na zaawansowanym etapie programu EMT, naturalnym wydawało się wprowadzenie modyfikacji genetycznych odwracającej stosunek AMPK $\alpha$ 1 w tych liniach. Zdecydowano się na trwałą modyfikację genetyczną przy użyciu systemu lentiwirusowego, ponieważ w założeniach projektu były zaplanowane eksperymenty *in vivo*. Dlatego, aby mieć możliwość używania tych samych, zmodyfikowanych linii komórkowych *in vitro* i w modelu zwierzęcym, modyfikacja lentiwirusami wprowadzającymi transgen do genomu była najlepszym wyborem. Przeprowadzone manipulacje pozwoliły obniżyć ekspresję AMPK $\alpha$ 1 w linii C-4I poniżej poziomu

natywnej ekspresji w niezmodyfikowanych komórkach HTB-35. Natomiast modyfikacja linii HTB-35 nie doprowadziła do podniesienia ilości transkryptu AMPK do poziomu występującego w linii C-4I, ale odnotowano wzrost ekspresji o ponad 50%. Wprowadzone modyfikacje miały wpływ na markery związane z EMT. Wykonane oznaczenia pokazały zmianę ekspresji kluczowych czynników transkrypcyjnych dla EMT – Snail, Slug i ZEB-1. W linii C-4I obniżenie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 podniosło poziom ekspresji czynników Snail i ZEB-1, natomiast w komórkach HTB-35 o zwiększonej ekspresji AMPK $\alpha$ 1 zaobserwowano dokładnie odwrotny efekt. Efekt ten świadczy bezpośrednio o modyfikacji procesu EMT [100]. Pewne wątpliwości budzi wynik uzyskany dla czynnika Slug, którego zmiany ekspresji są odwrotne do zmian zaobserwowanych dla pozostałych czynników. Warto jednak zauważyć, że zmodyfikowana linia HTB-35 GFP-P2A-AMPK wykazuje różnice w ekspresji także głównych markerów EMT jakimi są wimentyna i kadheryna E. Na tej linii widać częściowe odwrócenie fenotypu mezenchymalnego, co wyraża się poprzez zmianę ekspresji białek połączeń międzykomórkowych. Białka te także są opisywane w literaturze jako markery przejścia epitelialno-mezenchymalnego [104]. Linia komórkowa C-4I shAMPK $\alpha$ 1, oprócz zmian w ekspresji czynników transkrypcyjnych nie wykazywała istotnych różnic w ekspresji kadheryny E czy wimentyny. Sugeruje to, że samo obniżenie ekspresji kinazy AMPK nie jest czynnikiem wystarczającym do wystąpienia zmian w kierunku fenotypu mezenchymalnego. Zgadza się to z doniesieniami literaturowymi, które raczej wskazują na wyłączenie aktywności tej kinazy jako współwystępujące z nabywaniem zdolności inwazyjnych przez komórki nowotworowe [144].

Wyciszenie ekspresji kinazy AMPK $\alpha$  w komórkach C-4I przełożyło się jednak na zdolność komórek do wzrostu *in vivo*. Komórki te po przeszczepieniu do modelu mysiego NOD-SCID formowały większe i szybciej rosnące guzy, niż komórki niezmodyfikowane i shCTRL. Zgadza się to z danymi dostępnymi w literaturze, które korelują ekspresję AMPK $\alpha$  bezpośrednio z tempem wzrostu guzów w modelu mysim [145]. Wyciszenie ekspresji AMPK $\alpha$  nie wpłynęło jednak w żaden sposób na brak zdolności komórek C-4I do przerzutowania, ponieważ w wyizolowanym z myszy materiale (płuca, śledziona, szpik kostny) nie znaleziono śladów tych komórek (w postaci transkryptu ludzkiego genu  $\beta$ -aktyny). Biorąc pod uwagę brak istotnych zmian molekularnych związanych z EMT w

---

tych komórkach, oraz fakt że to właśnie EMT jest koniecznym mechanizmem do wystąpienia przerzutu w RSM [146] wynik ten nie jest zaskoczeniem.

Z kolei podniesienie ekspresji AMPK $\alpha$ 1 w komórkach HTB-35, które wiązało się z częściowym odwróceniem fenotypu mezenchymalnego *in vitro*, przełożyło się na zdolność tych komórek do przerzutowania *in vivo*. Wykonane oznaczenia w pobranym materiale od myszy szczepionych komórkami HTB-35 pozwoliło określić, że linia GFP-P2A-AMPK dużo słabiej przerzutowała niż niezmodyfikowane komórki HTB-35 i HTB-35 GFP. Jest to o tyle ciekawe, że większość publikacji podaje, że to aktywacja AMPK prowadzi do zmniejszenia możliwości tworzenia przerzutów [142], [147]. Jeśli jednak wziąć pod uwagę, że oznaczenie aktywności AMPK $\alpha$  metodą Western Blot pokazywało, że kinaza ta jest natywnie aktywna w komórkach tej linii (choć na niskim poziomie), zwiększenie ilości białka AMPK $\alpha$  będzie jednocześnie powodowało proporcjonalne zwiększenie aktywności.

Doświadczenie *in vivo* wykazało także, że komórki HTB-35 GFP-P2A-AMPK formowały nieznacznie większe guzy (widoczne na wykresie przesunięcie mediany masy guzów, ale brak istotności statystycznej). W przeprowadzonych eksperymentach *in vitro* określających wskaźniki zapotrzebowania na tlen, obydwie linie (C-4I shAMPK $\alpha$ 1 i HTB-35 GFP-P2A-AMPK) wykazywały zwiększenie zapotrzebowania na tlen świadczące o zwiększeniu zdolności adaptacyjnych komórek i zwiększeniu odporności na stres oksydacyjny oraz niekorzystne warunki. Jest to wynik pozornie zaskakujący, który jednak nie jest sprzeczny z doniesieniami literaturowymi pokazującymi, że kinaza AMPK może przyjmować różne funkcje w zależności od kontekstu molekularnego i metabolicznego [87], [94]. W szczególności, zarówno obniżenie ekspresji AMPK $\alpha$  w komórkach C-4I jak i uzyskanie nadekspresji w komórkach HTB-35, może prowadzić do promowania przeżycia przez te komórki. Wynikać to może z innej funkcji jaką pełni AMPK w tych komórkach. W linii C-4I, która zachowuje część właściwości prawidłowej tkanki epitelialnej, AMPK ciągle pełni prawidłową rolę „strażnika” metabolicznego, którego wyłączenie prowadzi do deregulacji metabolicznej i w konsekwencji (choć odległej) nabycia wyższego stopnia złośliwości. Natomiast w komórkach HTB-35, występuje stałe rozprzęgnięcie szlaków metabolicznych, w związku z czym kinaza AMPK wypada ze swojej funkcji. Komórki HTB-35 pozyskujące energię głównie w

---

procesie glikolizy [148] mogą wykorzystywać AMPK tylko w celu zwiększenia zdolności generowania energii, z pominięciem regulacji metabolicznej [149].

### 6.1. Molekularne mechanizmy wzajemnej regulacji EMT i AMPK

Opisane wcześniej różnice w funkcjonowaniu kinazy AMPK są jeszcze bardziej widoczne w eksperymentach *in vitro* z farmakologicznymi aktywatorami AMPK oraz czynnikami indukującymi wystąpienie EMT.

Jednym z najbardziej zaskakujących doświadczeń była inkubacja komórek C-4I z czynnikiem wzrostu hepatocytów (HGF) i czynnikiem pochodzenia stromalnego (SDF-1). W medium suplementowanym 10% FBS, komórki C-4I po 24 godzinnej inkubacji z każdym z tych czynników zmieniają swój fenotyp w stronę fenotypu inwazyjnego. Trzeba podkreślić, że efekt ten jest bardzo słabo widoczny dla czynnika SDF-1, natomiast bardzo wyraźny dla HGF i to na tym czynniku skupiono się w dalszych eksperymentach. Indukcja EMT czynnikiem HGF jest faktem znanym [150]–[152], natomiast zaskakujące było, że przeprowadzenie inkubacji z aktywatorem AMPK jakim jest AICAR całkowicie blokowało ten efekt. W pewnym stopniu było to także widoczne przy jednoczesnej inkubacji HGF z metforminą czy też inkubacji komórek z HGF w medium o niskim stężeniu glukozy, zatem każdy sposób aktywacji AMPK prowadził do inhibicji efektu rozpraszania komórek. Kolejnym interesującym faktem, było ustalenie, że długoterminowa – 24- i 48-godzinna inkubacja z HGF (a także z SDF-1) prowadziła do istotnego obniżenia ekspresji AMPK $\alpha$ 1. W celu dalszej analizy wpływu HGF na kinazę AMPK, oznaczano ekspresję i aktywację AMPK $\alpha$  na poziomie białka. Sprawdzono, że w komórkach C-4I HGF po godzinnej inkubacji aktywuje AMPK $\alpha$  na poziomie porównywalnym co AICAR i metformina. Natomiast po 24-godzinnej inkubacji, co zupełnie zaskakujące, w komórkach C-4I inkubowanych z metforminą i AICAR dochodziło do wyciszenia aktywacji AMPK $\alpha$ . Aktualnie nie znaleziono ani wytłumaczenia tego faktu, ani istniejących doniesień o takim fenomenie. Natomiast aktywacja AMPK powodowana działaniem HGF cały czas utrzymywała się na wysokim poziomie. Jednak jednoczesna inkubacja z HGF i aktywatorami AMPK, powodowała obniżenie aktywacji w stosunku do samego HGF. W przypadku inkubacji HGF i AICAR aktywacja miała niewiele wyższy poziom niż w przypadku samego AICAR. Trzeba

---

zaznaczyć, że po 24 godzinach inkubacji pojawiała się aktywacja AMPK $\alpha$  w komórkach znajdujących się w medium z 0,5% BSA, co być może spowodowane było niedostatkami substancji odżywczych w medium, który powoduje naturalną aktywację tej kinazy [153].

Zebrane fakty można ułożyć jednak w pewną całość, natomiast z powodu braku doniesień literaturowych na ten temat, jest to tylko hipoteza. Wy tłumaczeniem zaobserwowanych zjawisk, może być fakt, że komórki C-4I, jako posiadające pewne cechy prawidłowych komórek epitelialnych, zachowują także „reżim” metaboliczny. Oznacza to, że długotrwała i niefizjologiczna aktywacja kinazy AMPK będzie dla nich niekorzystna, ponieważ AMPK traci w takim przypadku właściwą jej funkcję, czyli przełącznika metabolicznego – ciągła aktywacja uniemożliwia reagowanie na zmiany. Dlatego, komórki wyłączają aktywność AMPK. Natomiast działanie HGF omija ten mechanizm i powoduje stałą aktywację AMPK $\alpha$ , prawdopodobnie poprzez zmianę stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> i aktywację CaMKK [154], [155] (możliwe zaangażowanie szlaków związanych z FOXO3a i AKT [156] lub kaskada LKB1/AMPK/eNOS [157]). Stąd, inkubacja z HGF (w medium z 10% FBS) prowadzi do rearanżacji cytoszkieletu i nabycia cech fenotypu inwazyjnego, ponieważ ciągle jest dostarczana energia ze strony AMPK. Z kolei obserwowane wyciszenie aktywności AMPK w przypadku jednoczesnej inkubacji z AICAR i HGF, tłumaczy zahamowanie rozpraszania komórek poprzez wyłączenie przełącznika jakim jest AMPK z generowania energii na procesy gromadzenia zapasów energetycznych.

Zupełnie inaczej przedstawia się aktywacja AMPK poprzez działanie HGF i farmakologicznych aktywatorów AMPK w komórkach HTB-35. Wspólną cechą z komórkami C-4I jest pojawienie się aktywacji AMPK $\alpha$  pod wpływem HGF po 1-godzinnej inkubacji i jej utrzymywanie się także po 24-godzinnej inkubacji. Podobną aktywację AMPK wykazują te komórki w inkubacji z AICAR – jednak nie występuje wyciszenie po 24 godzinach. W dodatku występuje efekt addytywny indukcji AMPK przez jednoczesne działanie HGF i AICAR, po 24-godzinnej inkubacji. Jednak w przypadku tych komórek występują dramatyczne zmiany nie tylko w aktywności, ale i ekspresji AMPK $\alpha$  pod wpływem metforminy. 24-godzinna inkubacja z tym związkiem powoduje około 90% spadek ekspresji AMPK $\alpha$  na poziomie białka. W dodatku w około 35% komórek występuje indukcja apoptozy. Jest możliwe, że zaznacza się tutaj aktywny mechanizm degradujący podjednostkę katalityczną AMPK $\alpha$ 1. Badania prowadzone

---

przez C.T Pineda i wsp. wykazały, że w komórkach nowotworowych uaktywnia się ligaza ubikwitynowa MAGE-A3/6-TRIM28 normalnie funkcjonująca w męskiej linii zarodkowej [158]. Autorzy dowiedli, że działanie tego enzymu powodowało ubikwitynację i następnie degradację podjednostki  $\alpha 1$  w różnych rodzajach nowotworów. Co istotne, wiązało się to z wystąpieniem hiper-wrażliwości komórek nowotworowych na działanie aktywatora AMPK jakim jest metformina. Występowanie tego mechanizmu w komórkach HTB-35 mogłoby tłumaczyć ich wysoką wrażliwość na długotrwałą inkubację z metforminą. Warto tu jeszcze dodać, że pomimo zupełnie innych wyników oznaczenia ekspresji i aktywności AMPK $\alpha 1$  w tych komórkach po 24-godzinnej inkubacji z metforminą a AICAR, w przypadku tego drugiego aktywatora, także następuje spadek żywotności komórek tylko jest on widoczny dopiero po 48 – 72 godzinach inkubacji. Występujące różnice pomiędzy inkubacjami z metforminą i AICAR mogą jednak wynikać z innej biologicznie zasady działania tych aktywatorów AMPK.

Zebrane wyniki pokazują różne oblicza AMPK w komórkach C-4I i HTB-35, wynikające najprawdopodobniej z różnic w stopniu zaawansowania i złośliwości komórek [159]. Komórki HTB-35 wykorzystują kinazę AMPK nie jako „strażnika” metabolizmu, a jako „pomocnika” w zdobywaniu energii, np. poprzez zaburzenia w gospodarce lipidowej. Natomiast użycie metforminy, której działanie jest mniej selektywne niż AICAR, w komórkach HTB-35 prowadzi do obniżenia efektywności pozyskiwania energii w procesie glikolizy i, w konsekwencji, śmierci komórek [148].

Podsumowując, badania związków kinazy AMPK i procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego, pozwala na poznanie szerszego, metabolicznego kontekstu przerzutowania nowotworów. Pomimo, że tematyka roli metabolizmu w nowotworzeniu i przerzutowaniu jest eksplorowana stosunkowo od niedawna, pojawia się co raz więcej publikacji na ten temat, a jednym z powodów do zwrócenia się w tę stronę było dostrzeżenie roli kinazy AMPK w regulacji wielu procesów wewnątrzkomórkowych.

AMPK można zdecydowanie postrzegać jako marker prognostyczny i warunkujący terapię antynowotworową w raku szyjki macicy. Pomimo faktu, że AMPK może występować w podwójnej roli w zależności od zaawansowania i stopnia złośliwości nowotworu, w przypadku RSM jest obiecującym celem terapeutycznym. Szczególnie w początkowych stadiach zaawansowania nowotworu działanie aktywatorów AMPK może pomóc w terapii onkologicznej. W zaawansowanym stadium nowotworu, lub mówiąc

bardziej precyzyjnie, w przypadku deregulacji funkcjonowania, ekspresji i aktywacji AMPK w komórkach RSM, przywrócenie ekspresji AMPK może być korkiem w stronę eliminacji komórek nowotworowych. O ile jednak terapie genowe są trudne w aplikacji, a ich efektywność często niewystarczająca, w przypadku CC, który związany jest z wyciszeniem AMPK, zastosowanie farmakologicznego aktywatora jakim jest metformina, może przynieść korzystne efekty, jak sugerują wykonane doświadczenia.



## 7. Wnioski

---

1. Transformacja nowotworowa prowadzi do deregulacji metabolicznej związanej wyłączeniem prawidłowego funkcjonowania „strażnika” homeostazy energetycznej jakim jest kinaza AMPK.
2. Wyłączenie kontroli metabolizmu ze strony AMPK podczas transformacji nowotworowej jest warunkiem koniecznym, ale niewystarczającym do nabycia fenotypu inwazyjnego i zdolności do przerzutowania.
3. Przywrócenie ekspresji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$  w komórkach nowotworowych, w których doszło do implementacji EMT, pozwala częściowo odwrócić ten proces i przywracać ekspresję markerów epitelialnych.
4. Obniżenie ekspresji podjednostki katalitycznej AMPK w komórkach nowotworowych o fenotypie epitelialnym, indukuje molekularne zmiany w kierunku EMT.
5. Kinaza AMPK może pełnić różną rolę w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu. W komórkach nowotworowych o niskim stopniu złośliwości, zachowuje częściowo zdolność do prawidłowego zarządzania homeostazą energetyczną komórki. W komórkach charakteryzujących się wysokim stopniem złośliwości, kinaza AMPK jest odpowiedzialna za większe zdolności adaptacyjne i przeżywalność komórek nowotworowych.
6. W komórkach nowotworowych posiadających częściowo właściwości prawidłowej tkanki epitelialnej, selektywna, bezpośrednia i długotrwała aktywacja kinazy AMPK jest niekorzystna dla komórek i zostaje przez komórki wyłączana.

7. Aktywacja AMPK i jej podtrzymywanie indukowane działaniem czynnika HGF jest związane z generowaniem energii potrzebnej do rearanzacji cytoszkieletu i nabywania fenotypu migracyjnego.
  
8. Przywrócenie ekspresji podjednostki katalitycznej AMPK $\alpha$  w komórkach nowotworowych o wysokim stopniu złośliwości, obniża ich zdolność do tworzenia przerzutów *in vivo*.
  
9. AMPK można być markerem prognostycznym i warunkującym terapię antynowotworową w raku szyjki macicy.
  
10. AMPK jest obiecującym celem terapeutycznym w raku szyjki macicy

## 8. Literatura

---

- 
- [1] J. Zhu and C. B. Thompson, "Metabolic regulation of cell growth and proliferation," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 20, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 436–450, 11-Jul-2019.
- [2] M. L. Rodriguez, "Deregulation of Energy Metabolism as a Cause and Consequence of Oncogenic Process: Review of Literature," *Anat. Physiol.*, vol. 06, no. 02, pp. 1–5, 2016.
- [3] R. J. DeBerardinis and N. S. Chandel, "Fundamentals of cancer metabolism," *Sci. Adv.*, vol. 2, no. 5, p. e1600200, 2016.
- [4] N. N. Pavlova and C. B. Thompson, "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism," *Cell Metab.*, vol. 23, no. 1, pp. 27–47, 2016.
- [5] P. R. Rich, "The molecular machinery of Keilin's respiratory chain," in *Biochemical Society Transactions*, 2003, vol. 31, no. 6, pp. 1095–1105.
- [6] K. O. Alfarouk *et al.*, "Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question," *Oncoscience*, vol. 1, no. 12, pp. 777–802, 2014.
- [7] O. Warburg, "On the Origin of Cancer Cells," *Science (80-. )*, vol. 123, no. 3191, pp. 309–314, Feb. 1956.
- [8] O. Warburg, "The Metabolism of Carcinoma Cells," *J. Cancer Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 148–163, Mar. 1925.
- [9] E. Racker, "Bioenergetics and the problem of tumor growth.," *Am. Sci.*, vol. 60, no. 1, pp. 56–63.
- [10] M. V Liberti and J. W. Locasale, "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 211–218, Mar. 2016.
- [11] L. Schwartz, C. Supuran, and K. Alfarouk, "The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 17, no. 2, pp. 164–170, Jan. 2017.
- [12] C. V Dang, "Links between metabolism and cancer.," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 9, pp. 877–90, May 2012.
- [13] S. Y. Lunt and M. G. Vander Heiden, "Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 441–464, Nov. 2011.
- [14] K. E. Wellen and C. B. Thompson, "A two-way street: Reciprocal regulation of metabolism and signalling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 270–276, 07-Apr-2012.
- [15] A. Carracedo, L. C. Cantley, and P. P. Pandolfi, "Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 4, pp. 227–232, Apr. 2013.
- [16] P. S. Ward and C. B. Thompson, "Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 297–308, Mar. 2012.
- [17] N. S. Madhukar, M. O. Warmoes, and J. W. Locasale, "Organization of enzyme concentration across the metabolic network in cancer cells," *PLoS One*, vol. 10, no. 1, p. e0117131, Jan. 2015.
- [18] A. A. Shestov *et al.*, "Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step," *Elife*, vol. 3, no. July2014, pp. 1–18, Jul. 2014.
- [19] T. Pfeiffer, S. Schuster, and S. Bonhoeffer, "Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways," *Science (80-. )*, vol. 292, no. 5516, pp. 504–507, Apr. 2001.
- [20] C.-H. Chang *et al.*, "Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a
-

- Driver of Cancer Progression,” *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1229–1241, Sep. 2015.
- [21] O. R. Colegio *et al.*, “Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid,” *Nature*, vol. 513, no. 7519, pp. 559–563, Sep. 2014.
- [22] P.-C. Ho *et al.*, “Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses,” *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1217–1228, Sep. 2015.
- [23] J. W. Locasale and L. C. Cantley, “Metabolic Flux and the Regulation of Mammalian Cell Growth,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 4, pp. 443–451, Oct. 2011.
- [24] L. A. Sena and N. S. Chandel, “Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species,” *Mol. Cell*, vol. 48, no. 2, pp. 158–167, Oct. 2012.
- [25] G.-Y. Liou and P. Storz, “Reactive oxygen species in cancer,” *Free Radic. Res.*, vol. 44, no. 5, pp. 479–496, May 2010.
- [26] D. R. Donohoe, L. B. Collins, A. Wali, R. Bigler, W. Sun, and S. J. Bultman, “The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation,” *Mol. Cell*, vol. 48, no. 4, pp. 612–626, Nov. 2012.
- [27] Z. H. Beg, D. W. Allmann, and D. M. Gibson, “Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 54, no. 4, pp. 1362–1369, Oct. 1973.
- [28] C. A. Carlson and K. H. Kim, “Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 248, no. 1, pp. 378–80, Jan. 1973.
- [29] L. A. Yeh, K. H. Lee, and K. H. Kim, “Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge,” *J. Biol. Chem.*, vol. 255, no. 6, pp. 2308–14, Mar. 1980.
- [30] D. Carling, P. R. Clarke, V. A. Zammit, and D. G. Hardie, “Purification and characterization of the AMP- activated protein kinase: Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3- hydroxy- 3- methylglutaryl- CoA reductase kinase activities,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 186, no. 1–2, pp. 129–136, Dec. 1989.
- [31] L. A. Witters, B. E. Kemp, and A. R. Means, “Chutes and Ladders: The search for protein kinases that act on AMPK,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 31, no. 1, pp. 13–16, Jan-2006.
- [32] S. Wang, P. Song, and M. H. Zou, “AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases,” *Clinical Science*, vol. 122, no. 12. NIH Public Access, pp. 555–573, Jun-2012.
- [33] P. T. Mungai *et al.*, “Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 17, pp. 3531–3545, Sep. 2011.
- [34] G. R. Steinberg and B. E. Kemp, “AMPK in Health and Disease,” *Physiol. Rev.*, vol. 89, no. 3, pp. 1025–1078, 2009.
- [35] D. G. Hardie, “AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function,” *Genes and Development*, vol. 25, no. 18. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1895–1908, 2011.
- [36] M. M. Mihaylova and R. J. Shaw, “The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism,” *Nature Cell Biology*, vol. 13, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 1016–1023, 02-Sep-2011.
- [37] S. M. Jeon, “Regulation and function of AMPK in physiology and diseases,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 48, no. 7, p. e245, 2016.

- [38] W. Li, S. M. Saud, M. R. Young, G. Chen, and B. Hua, "Targeting AMPK for cancer prevention and treatment," *Oncotarget*, vol. 6, no. 10. Impact Journals, LLC, pp. 7365–7378, 10-Apr-2015.
- [39] J. S. Oakhill, J. W. Scott, and B. E. Kemp, "Structure and function of AMP-activated protein kinase," *Acta Physiol.*, vol. 196, no. 1, pp. 3–14, 2009.
- [40] R. Willows, N. Navaratnam, A. Lima, J. Read, and D. Carling, "Effect of different  $\gamma$ -subunit isoforms on the regulation of AMPK," *Biochem. J.*, vol. 474, no. 10, pp. 1741–1754, 2017.
- [41] D. G. Hardie, "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 774–785, Oct. 2007.
- [42] T. Quentin, J. Kitz, M. Steinmetz, A. Poppe, K. Bär, and R. Krätzner, "Different expression of the catalytic alpha subunits of the AMP activated protein kinase--an immunohistochemical study in human tissue.," *Histol. Histopathol.*, vol. 26, no. 5, pp. 589–96, 2011.
- [43] J. B. Birk and J. F. P. Wojtaszewski, "Predominant  $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$  AMPK activation during exercise in human skeletal muscle," *J. Physiol.*, vol. 577, no. 3, pp. 1021–1032, Dec. 2006.
- [44] P. C. Cheung, I. P. Salt, S. P. Davies, D. G. Hardie, and D. Carling, "Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding.," *Biochem. J.*, vol. 346 Pt 3, pp. 659–69, Mar. 2000.
- [45] P. Sanz, "AMP-activated protein kinase: structure and regulation.," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 9, no. 5, pp. 478–92, Oct. 2008.
- [46] D. Grahame Hardie, "AMP-Activated Protein Kinase," *Handb. Cell Signal.*, vol. 1–3, pp. 535–537, 2003.
- [47] D. S. Novikova, A. V. Garabadzhiu, G. Melino, N. A. Barlev, and V. G. Tribulovich, "AMP-activated protein kinase: Structure, function, and role in pathological processes," *Biochem.*, vol. 80, no. 2, pp. 127–144, Feb. 2015.
- [48] Y. Oligschlaeger *et al.*, "The recruitment of AMP-activated protein kinase to glycogen is regulated by autophosphorylation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 18, pp. 11715–28, May 2015.
- [49] T. J. Iseli *et al.*, "AMP-activated protein kinase  $\beta$  subunit tethers  $\alpha$  and  $\gamma$  subunits via its c-terminal sequence (186-270)," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 14, pp. 13395–13400, Apr. 2005.
- [50] N. Ali *et al.*, " $\beta$ -subunit myristoylation functions as an energy sensor by modulating the dynamics of AMP-activated Protein Kinase," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 39417, Dec. 2016.
- [51] Y. Yan, X. E. Zhou, H. E. Xu, and K. Melcher, "Structure and Physiological Regulation of AMPK," *International journal of molecular sciences*, vol. 19, no. 11. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 09-Nov-2018.
- [52] F. A. Ross, C. MacKintosh, and D. G. Hardie, "AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours.," *FEBS J.*, vol. 283, no. 16, pp. 2987–3001, 2016.
- [53] B. Viollet *et al.*, "AMPK inhibition in health and disease.," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 45, no. 4, pp. 276–95, Aug. 2010.
- [54] J. W. Scott *et al.*, "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 2, pp. 274–284, Jan. 2004.
- [55] B. Xiao *et al.*, "Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase," *Nature*, vol. 449, no. 7161, pp. 496–500, Sep. 2007.
- [56] R. Willows, N. Navaratnam, A. Lima, J. Read, and D. Carling, "Effect of different

- $\gamma$ -subunit isoforms on the regulation of AMPK,” *Biochem. J.*, vol. 474, no. 10, pp. 1741–1754, 2017.
- [57] T. Pang *et al.*, “Conserved  $\alpha$ -Helix Acts as Autoinhibitory Sequence in AMP-activated Protein Kinase  $\alpha$  Subunits,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 1, pp. 495–506, Jan. 2007.
- [58] L. Chen *et al.*, “Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase,” *Nature*, vol. 459, no. 7250, pp. 1146–1149, Jun. 2009.
- [59] X. Li *et al.*, “Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen,” *Cell Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 50–66, Jan. 2015.
- [60] L. Chen *et al.*, “Conserved regulatory elements in AMPK,” *Nature*, vol. 498, no. 7453, pp. E8–E10, Jun. 2013.
- [61] F.-J. Xin, J. Wang, R.-Q. Zhao, Z.-X. Wang, and J.-W. Wu, “Coordinated regulation of AMPK activity by multiple elements in the  $\alpha$ -subunit,” *Cell Res.*, vol. 23, no. 10, pp. 1237–1240, Oct. 2013.
- [62] J. W. Scott, F. A. Ross, J. K. D. Liu, and D. G. Hardie, “Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the  $\gamma$  subunit,” *EMBO J.*, vol. 26, no. 3, pp. 806–815, Feb. 2007.
- [63] M. J. Sanders, P. O. Grondin, B. D. Hegarty, M. A. Snowden, and D. Carling, “Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade,” *Biochem. J.*, vol. 403, no. 1, pp. 139–148, Apr. 2007.
- [64] G. J. Gowans, S. A. Hawley, F. A. Ross, and D. G. Hardie, “AMP is a true physiological regulator of amp-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation,” *Cell Metab.*, vol. 18, no. 4, pp. 556–566, 2013.
- [65] M. Kim and R. Tian, “Targeting AMPK for cardiac protection: opportunities and challenges,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 51, no. 4, pp. 548–53, Oct. 2011.
- [66] B. Burwinkel *et al.*, “Fatal Congenital Heart Glycogenosis Caused by a Recurrent Activating R531Q Mutation in the  $\gamma$ 2-Subunit of AMP-Activated Protein Kinase (PRKAG2), Not by Phosphorylase Kinase Deficiency,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 76, no. 6, pp. 1034–1049, Jun. 2005.
- [67] X. Jin, R. Townley, and L. Shapiro, “Structural Insight into AMPK Regulation: ADP Comes into Play,” *Structure*, vol. 15, no. 10, pp. 1285–1295, Oct. 2007.
- [68] D. Carling, M. J. Sanders, and A. Woods, “The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases,” *Int. J. Obes.*, vol. 32, no. S4, pp. S55–S59, Sep. 2008.
- [69] M. Suter, U. Riek, R. Tuerk, U. Schlattner, T. Wallimann, and D. Neumann, “Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 43, pp. 32207–32216, Oct. 2006.
- [70] V. Launonen, “Mutations in the human LKB1/STK11 gene,” *Human Mutation*, vol. 26, no. 4, pp. 291–297, Oct-2005.
- [71] F. Lan, J. M. Cacicedo, N. Ruderman, and Y. Ido, “SIRT1 Modulation of the Acetylation Status, Cytosolic Localization, and Activity of LKB1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 41, pp. 27628–27635, Oct. 2008.
- [72] E. Yamada, J. E. Pessin, I. J. Kurland, G. J. Schwartz, and C. C. Bastie, “Fyn-Dependent Regulation of Energy Expenditure and Body Weight Is Mediated by Tyrosine Phosphorylation of LKB1,” *Cell Metab.*, vol. 11, no. 2, pp. 113–124, Feb. 2010.
- [73] S. A. Hawley *et al.*, “Calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase,” *Cell Metab.*, vol.



- 2, no. 1, pp. 9–19, Jul. 2005.
- [74] R. L. Hurley, K. A. Anderson, J. M. Franzone, B. E. Kemp, A. R. Means, and L. A. Witters, “The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 32, pp. 29060–29066, Aug. 2005.
- [75] M. Xie *et al.*, “A pivotal role for endogenous TGF- $\beta$ -activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 46, pp. 17378–17383, Nov. 2006.
- [76] D. Neumann, “Is TAK1 a direct upstream kinase of AMPK?,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 8. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 15-Aug-2018.
- [77] J. Cheng, T. Zhang, H. Ji, K. Tao, J. Guo, and W. Wei, “Functional characterization of AMP-activated protein kinase signaling in tumorigenesis,” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1866, no. 2. NIH Public Access, pp. 232–251, 2016.
- [78] A. Woods *et al.*, “Identification of Phosphorylation Sites in AMP-activated Protein Kinase (AMPK) for Upstream AMPK Kinases and Study of Their Roles by Site-directed Mutagenesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 31, pp. 28434–28442, Aug. 2003.
- [79] Y. Zhao *et al.*, “ROS signaling under metabolic stress: Cross-talk between AMPK and AKT pathway,” *Mol. Cancer*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [80] S. A. Hawley, F. A. Ross, G. J. Gowans, P. Tibarewal, N. R. Leslie, and D. G. Hardie, “Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- $\alpha$ 1 down-regulates its activation in tumour cells,” *Biochem. J.*, vol. 459, no. 2, pp. 275–287, 2014.
- [81] B. K. Joseph *et al.*, “Inhibition of AMP kinase by the protein phosphatase 2A heterotrimer, PP2A<sup>pp2r2d</sup>,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 17, pp. 10588–10598, 2015.
- [82] N. Musi and L. J. Goodyear, “AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake,” *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 178, no. 4, pp. 337–345, Aug-2003.
- [83] S. B. Jørgensen, E. A. Richter, and J. F. P. Wojtaszewski, “Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise,” *Journal of Physiology*, vol. 574, no. 1, pp. 17–31, 01-Jul-2006.
- [84] F. Heidrich *et al.*, “AMPK - Activated Protein Kinase and its Role in Energy Metabolism of the Heart,” *Curr. Cardiol. Rev.*, vol. 6, no. 4, pp. 337–342, Nov. 2010.
- [85] W. Abbud *et al.*, “Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 380, no. 2, pp. 347–352, Aug. 2000.
- [86] E. Sarnowska, A. Balcerak, M. Olszyna-Serementa, D. Kotlarek, T. J. Sarnowski, and J. A. Siedlecki, “Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) jako cel terapeutyczny,” *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 67, pp. 750–760, 2013.
- [87] H.-C. Chuang, C.-C. Chou, S. K. Kulp, and C.-S. Chen, “AMPK as a potential anticancer target - friend or foe?,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 20, no. 15, pp. 2607–18, 2014.
- [88] Q. Wang, S. Liu, A. Zhai, B. Zhang, and G. Tian, “AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 41, no. 7, pp. 985–993, Jul. 2018.
- [89] D. G. Hardie and D. A. Pan, “Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase,” in *Biochemical Society Transactions*, 2002, vol. 30, no. 6, pp. 1064–1070.

- 
- [90] B. Viollet *et al.*, “Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: A new strategy for the management of metabolic hepatic disorders,” *Journal of Physiology*, vol. 574, no. 1. pp. 41–53, 01-Jul-2006.
- [91] J. M. M. Evans, L. A. Donnelly, A. M. Emslie-Smith, D. R. Alessi, and A. D. Morris, “Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients,” *Br. Med. J.*, vol. 330, no. 7503, pp. 1304–1305, Jun. 2005.
- [92] S. Fogarty and D. G. Hardie, “Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer,” *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1804, no. 3. pp. 581–591, Mar-2010.
- [93] Z. Luo, M. Zang, and W. Guo, “AMPK as a metabolic tumor suppressor: Control of metabolism and cell growth,” *Future Oncology*, vol. 6, no. 3. NIH Public Access, pp. 457–470, Mar-2010.
- [94] B. Faubert, E. E. Vincent, M. C. Poffenberger, and R. G. Jones, “The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator,” *Cancer Lett.*, vol. 356, no. 2, pp. 165–170, 2015.
- [95] T. L. Ng *et al.*, “The AMPK stress response pathway mediates anoikis resistance through inhibition of mTOR and suppression of protein synthesis,” *Cell Death Differ.*, vol. 19, no. 3, pp. 501–510, Mar. 2012.
- [96] Z. T. Schafer *et al.*, “Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment,” *Nature*, vol. 461, no. 7260, pp. 109–113, Sep. 2009.
- [97] D. G. Hardie and D. R. Alessi, “LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after,” *BMC Biol.*, vol. 11, p. 36, Jan. 2013.
- [98] R. Rattan, S. Giri, A. K. Singh, and I. Singh, “5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo via AMP-activated protein kinase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 47, pp. 39582–39593, Nov. 2005.
- [99] S. Fogarty, F. A. Ross, D. V. Ciruelos, A. Gray, G. J. Gowans, and D. G. Hardie, “AMPK causes cell cycle arrest in LKB1-deficient cells via activation of CAMKK2,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 14, no. 8, pp. 683–695, 2016.
- [100] R. Kalluri and R. A. Weinberg, “The basics of epithelial-mesenchymal transition,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 119, no. 6. American Society for Clinical Investigation, pp. 1420–1428, Jun-2009.
- [101] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, no. 3. pp. 178–196, 21-Mar-2014.
- [102] J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. J. Huang, and M. A. Nieto, “Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease,” *Cell*, vol. 139, no. 5. Cell Press, pp. 871–890, 25-Nov-2009.
- [103] T. Chen, Y. You, H. Jiang, and Z. Z. Wang, “Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 232, no. 12. pp. 3261–3272, Dec-2017.
- [104] Y. Zhang and R. A. Weinberg, “Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities,” *Frontiers of Medicine*, vol. 12, no. 4. NIH Public Access, pp. 361–373, Aug-2018.
- [105] G. F. Le Bras, K. J. Taubenslag, and C. D. Andl, “The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression,” *Cell Adhesion and Migration*, vol. 6, no. 4. Taylor & Francis, pp. 365–373, 2012.
- [106] K. Miekus *et al.*, “MET receptor is a potential therapeutic target in high grade
-

- cervical cancer.,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 12, pp. 10086–101, Apr. 2015.
- [107] P. Nisticò, M. J. Bissell, and D. C. Radisky, “Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 2, p. a011908, Feb. 2012.
- [108] J. Roche, “The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer.,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 2, Feb. 2018.
- [109] X. Liu, H. Huang, N. Remmers, and M. A. Hollingsworth, “Loss of E-cadherin and epithelial to mesenchymal transition is not required for cell motility in tissues or for metastasis,” *Tissue Barriers*, vol. 2, no. 4, p. e969112, Aug. 2014.
- [110] F. M. Davis, T. A. Stewart, E. W. Thompson, and G. R. Monteith, “Targeting EMT in cancer: Opportunities for pharmacological intervention,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 35, no. 9, pp. 479–488, Sep-2014.
- [111] M. Tyszka-Czochara, P. Konieczny, and M. Majka, “Recent advances in the role of AMP-activated protein kinase in metabolic reprogramming of metastatic cancer cells: targeting cellular bioenergetics and biosynthetic pathways for anti-tumor treatment,” *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, vol. 69, no. 3. 2018.
- [112] C. Qu, W. Zhang, G. Zheng, Z. Zhang, J. Yin, and Z. He, “Metformin reverses multidrug resistance and epithelial-mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells.,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 386, no. 1–2, pp. 63–71, Jan. 2014.
- [113] N.-S. Li *et al.*, “LKB1/AMPK inhibits TGF- $\beta$ 1 production and the TGF- $\beta$  signaling pathway in breast cancer cells,” *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 6, pp. 8249–8258, 2016.
- [114] M. G. Bonini and B. N. Gantner, “The multifaceted activities of AMPK in tumor progression - Why the ‘one size fits all’ definition does not fit at all?,” *IUBMB Life*, vol. 65, no. 11, pp. 889–896, 2013.
- [115] J. M. Goodwin, R. U. Svensson, H. J. Lou, M. M. Winslow, B. E. Turk, and R. J. Shaw, “An AMPK-independent signaling pathway downstream of the LKB1 tumor suppressor controls snail1 and metastatic potential,” *Mol. Cell*, vol. 55, no. 3, pp. 436–450, Aug. 2014.
- [116] E.-K. Kim *et al.*, “Activation of AMP-activated Protein Kinase Is Essential for Lysophosphatidic Acid-induced Cell Migration in Ovarian Cancer Cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 27, pp. 24036–24045, 2011.
- [117] M. Saxena *et al.*, “AMP-activated protein kinase promotes epithelial-mesenchymal transition in cancer cells through Twist1 upregulation,” *J. Cell Sci.*, vol. 131, no. 14, Jul. 2018.
- [118] J. Banyard and D. R. Bielenberg, “The role of EMT and MET in cancer dissemination,” *Connective Tissue Research*, vol. 56, no. 5. NIH Public Access, pp. 403–413, 2015.
- [119] D. Pei, X. Shu, A. Gassama-Diagne, and J. P. Thiery, “Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming,” *Nature Cell Biology*, vol. 21, no. 1, pp. 44–53, 02-Jan-2019.
- [120] R. Li *et al.*, “A mesenchymal-to-Epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts,” *Cell Stem Cell*, vol. 7, no. 1, pp. 51–63, Jul. 2010.
- [121] D. Yao, C. Dai, and S. Peng, “Mechanism of the Mesenchymal – Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation,” vol. 9, no. December, pp. 1608–1621, 2011.

- [122] R. H. M. Schwab, N. Amin, D. J. Flanagan, T. M. Johanson, T. J. Phesse, and E. Vincan, "Wnt is necessary for mesenchymal to epithelial transition in colorectal cancer cells," *Dev. Dyn.*, vol. 247, no. 3, pp. 521–530, Mar. 2018.
- [123] M. Yan and Q. Liu, "Differentiation therapy: A promising strategy for cancer treatment," *Chin. J. Cancer*, vol. 35, no. 1, p. 3, Jan. 2016.
- [124] S. M. Jeon and N. Hay, "The double-edged sword of AMPK signaling in cancer and its therapeutic implications," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 346–357, 2015.
- [125] G. Zadra, J. L. Batista, and M. Loda, "Dissecting the dual role of AMPK in cancer: From experimental to human studies," *Molecular Cancer Research*, vol. 13, no. 7, pp. 1059–1072, 01-Jul-2015.
- [126] World Health Organisation, "WHO | Cervical cancer," *WHO website*. World Health Organization, 2018.
- [127] Krajowy Rejestr Nowotworów, "Nowotwory szyjki macicy," 2018. [Online]. Available: <http://onkologia.org.pl/nowotwory-szyjki-macicy-kobiet/>. [Accessed: 25-May-2019].
- [128] PDQ Adult Treatment Editorial Board, *Cervical Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version*. 2002.
- [129] C. Marth, F. Landoni, S. Mahner, M. McCormack, A. Gonzalez-Martin, and N. Colombo, "Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann. Oncol.*, vol. 28, no. suppl\_4, pp. iv72–iv83, Jul. 2017.
- [130] J. S. Reis-Filho, J. F. Neto, E. Schonemann, Â. Sanderson, and F. C. Schmitt, "Glassy cell carcinoma of the uterine cervix: Report of a case with cytohistologic and immunohistochemical study," *Acta Cytol.*, vol. 45, no. 3, pp. 407–410, 2001.
- [131] C. B. Tempfer *et al.*, "Neuroendocrine carcinoma of the cervix: A systematic review of the literature," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 530, Dec. 2018.
- [132] P. Tsikouras *et al.*, "Cervical cancer: Screening, diagnosis and staging," *Journal of B.U.ON.*, vol. 21, no. 2, pp. 320–325, 2016.
- [133] F. X. Bosch and S. De Sanjosé, "The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer," *Disease Markers*, vol. 23, no. 4. Hindawi Limited, pp. 213–227, 2007.
- [134] M. Y. Lee and M. R. Shen, "Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–13, 2012.
- [135] E. Sarnowska, A. Balcerak, M. Olszyna-serementa, D. Kotlarek, T. J. Sarnowski, and J. A. Siedlecki, "Kinaza białkowa aktywowana przez AMP ( AMPK ) jako cel terapeutyczny AMP-activated protein kinase ( AMPK ) as therapeutic target," pp. 750–760, 2013.
- [136] X. Sun, Q. Yang, C. J. Rogers, M. Du, and M. J. Zhu, "AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression," *Cell Death Differ.*, vol. 24, no. 5, pp. 819–831, 2017.
- [137] C. W. Lee *et al.*, "AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 17, pp. 4394–4404, 2012.
- [138] N. Nishida, T. Nishimura, T. Ito, T. Komeda, Y. Fukuda, and K. Nakao, "Chromosomal instability and human hepatocarcinogenesis," *Histology and Histopathology*, vol. 18, no. 3, pp. 897–909, 2003.
- [139] K. Akagi *et al.*, "Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability," *Genome Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 185–199, Feb. 2014.

- [140] X. He, C. Li, R. Ke, L. Luo, and D. Huang, "Down-regulation of adenosine monophosphate-activated protein kinase activity: A driver of cancer," *Tumor Biology*, vol. 39, no. 4. p. 101042831769757, 05-Apr-2017.
- [141] S. M. Hadad *et al.*, "Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer," *BMC Cancer*, vol. 9, p. 307, 2009.
- [142] K. Chen *et al.*, "Loss of AMPK activation promotes the invasion and metastasis of pancreatic cancer through an HSF1-dependent pathway," *Mol. Oncol.*, vol. 11, no. 10, pp. 1475–1492, 2017.
- [143] S. N. Wingo *et al.*, "Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, p. e5137, 2009.
- [144] W. Li, S. M. Saud, M. R. Young, G. Chen, and B. Hua, "Targeting AMPK for cancer prevention and treatment," *Oncotarget*, vol. 6, no. 10. Impact Journals, LLC, pp. 7365–7378, 10-Apr-2015.
- [145] J. Cheng *et al.*, "AMP-activated protein kinase suppresses the in vitro and in vivo proliferation of hepatocellular carcinoma," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, pp. 1–10, 2014.
- [146] M. Y. Lee, C. Y. Chou, M. J. Tang, and M. R. Shen, "Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: Correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 15, pp. 4743–4750, Aug. 2008.
- [147] W. Cao, J. Li, Q. Hao, J. V Vadgama, and Y. Wu, "AMP-activated protein kinase: A potential therapeutic target for triple-negative breast cancer 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis," *Breast Cancer Research*, vol. 21, no. 1. BioMed Central, p. 29, 21-Dec-2019.
- [148] M. Tyszka-Czochara, K. Bukowska-Strakova, K. A. Kocemba-Pilarczyk, and M. Majka, "Caffeic acid targets AMPK signaling and regulates tricarboxylic acid cycle anaplerosis while metformin downregulates HIF-1 $\alpha$ -induced glycolytic enzymes in human cervical squamous cell carcinoma lines," *Nutrients*, vol. 10, no. 7, p. 841, 2018.
- [149] D. Vara-Ciruelos, F. M. Russell, and D. G. Hardie, "The strange case of AMPK and cancer: Dr Jekyll or Mr Hyde?," *Open Biol.*, vol. 9, no. 7, p. 190099, Jul. 2019.
- [150] F. Liu *et al.*, "HGF induces EMT in non-small-cell lung cancer through the hBVR pathway," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 811, pp. 180–190, Sep. 2017.
- [151] J. Farrell *et al.*, "HGF Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Modulating the Mammalian Hippo/MST2 and ISG15 Pathways," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 6, pp. 2874–2886, Jun. 2014.
- [152] B. Szewczyk, K. Skrzypek, and M. Majka, "Targeting MET Receptor in Rhabdomyosarcoma: Rationale and Progress.," *Curr. Drug Targets*, vol. 18, no. 1, pp. 98–107, 2017.
- [153] G. R. Steinberg and B. E. Kemp, "AMPK in Health and Disease," *Physiol Rev.*, vol. 89, no. 0031-9333 (Print), pp. 1025–1078, 2009.
- [154] M. Majka, J. Drukala, E. Lesko, M. Wysoczynski, A. B. Jenson, and M. Z. Ratajczak, "SDF-1 alone and in co-operation with HGF regulates biology of human cervical carcinoma cells," *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 44, no. 3, pp. 155–164, 2006.
- [155] W. Choi, J. Lee, J. Lee, S. H. Lee, and S. Kim, "Hepatocyte Growth Factor Regulates Macrophage Transition to the M2 Phenotype and Promotes Murine Skeletal Muscle Regeneration," *Front. Physiol.*, vol. 10, p. 914, Jul. 2019.
- [156] C. C. Chou *et al.*, "AMPK reverses the mesenchymal phenotype of cancer cells by targeting the Akt-MDM2-Foxo3a signaling axis," *Cancer Res.*, vol. 74, no. 17, pp. 4783–4795, 2014.

- 
- [157] M. Vázquez-Chantada *et al.*, “Evidence for LKB1/AMP-activated protein kinase/endothelial nitric oxide synthase cascade regulated by hepatocyte growth factor, S-adenosylmethionine, and nitric oxide in hepatocyte proliferation,” *Hepatology*, vol. 49, no. 2, pp. 608–617, 2009.
- [158] C. T. Pineda *et al.*, “Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase,” *Cell*, vol. 160, no. 4, pp. 715–728, Feb. 2015.
- [159] M. Tyszka-Czochara, M. Lasota, and M. Majka, “Caffeic acid and metformin inhibit invasive phenotype induced by TGF- $\beta$ 1 in C-4I and HTB-35/SiHa human cervical squamous carcinoma cells by acting on different molecular targets,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 1, Jan. 2018.